

Н-198

Ч. Кантор, П. Шиммел

БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ





BIOPHYSICAL CHEMISTRY

Part II

Techniques for the Study of Biological Structure and Function

Charles R. Cantor
Columbia University

Paul R. Schimmel
Massachusetts Institute of
Technology

W. H. Freeman and Company

San Francisco

Ч.Кантор, П.Шиммел

БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

В трех томах

Том 2

Перевод с английского

Под редакцией
д-ра хим. наук А. А. Богданова,
д-ра физ.-мат. наук Ю. С. Лазуркина,
д-ра физ.-мат. наук М. Д. Франк-Каменецкого

МОСКВА «МИР» 1984

ББК 28.072

К 19

УДК 577

Кантор Ч., Шиммел П.

К 19 Биофизическая химия: В 3-х т. Пер. с англ. — М.: Мир, 1984. — Т. 2 — 496 с., ил.

В трехтомном издании, написанном учеными из США, на самом современном уровне изложены основные представления о биологических макромолекулах и методах исследования их структуры и функций. Второй том посвящен теоретическим основам физических и физико-химических методов изучения структуры биологических полимеров и интерпретации полученных данных. Рассмотрены абсорбционная спектроскопия, спектрополяриметрия, флуоресцентная спектроскопия, спектроскопия комбинационного рассеяния, ядерный магнитный резонанс, некоторые виды электронной микроскопии, ультрацентрифугирование, вискозиметрия и электрофорез в гелях; особенно подробно описан рентгеноструктурный анализ.

Для биофизиков, биохимиков, молекулярных биологов, физиков, химиков, для преподавателей, аспирантов и студентов биологических специальностей.

К 2001040000—009
041(01)—84 св. пл. подп. изд-е, 83

ББК 28.072

57.04

Редакция литературы по биологии

© 1980 by W. H. Freeman and Company

© Перевод на русский язык,
«Мир», 1984

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ БИОПОЛИМЕРОВ

Определение структуры молекул представляет собой грандиозную задачу, и ни один из известных в настоящее время методов не может справиться с ней в одиночку. В ряде случаев конечной целью является определение координат всех атомов, входящих в состав белка или нуклеиновой кислоты. В молекуле, масса которой составляет 30 000 дальтон, содержится приблизительно 4000 атомов. Положение каждого из этих N атомов в пространстве определяется тремя координатами. Поскольку в данном случае не имеет значения, каковы ориентация или положение в пространстве всей молекулы, шесть координат являются произвольными. Чтобы определить структуру молекулы, требуется измерить $3N - 6$ параметров. Кроме того, требуется установить, что за атом находится в соответствующей позиции внутри молекулы, т.е. прибавляется еще N неизвестных.

Для того чтобы полностью определить структуру обыкновенного белка с мол. массой $\sim 30\,000$ или нуклеиновой кислоты с такой же мол. массой, потребовалось бы найти 16 000 неизвестных. Если исключить из рассмотрения атомы водорода, то это число сокращается наполовину. Но даже и в этом случае требования продолжают оставаться чрезмерными. Ни один из известных в настоящее время методов не может предоставить такое количество подробной информации об одной и той же системе. С помощью некоторых методов из числа наиболее распространенных мы получаем фактически лишь один или два параметра, которые могут быть полезны для характеристики макромолекулярной системы.

К счастью, на практике ситуация редко выглядит настолько мрачной, как это было только что описано. Первичная структура исследуемой макромолекулы обычно бывает уже известна. В этом случае остается определить все длины связей и углы между соседними связями, а также (для всех атомов, кроме водорода) угол внутреннего вращения; для структуры из 4000 атомов требуется определить, таким образом, около 10 000 параметров. Часто бывает известна точная химическая структура (т.е. длины связей и углы между связями) каждого остатка, входящего в состав исследуемого биополимера. В таких случаях остается определить лишь взаимное расположение этих остатков, т.е. для решения задачи требуется определить около 2000 параметров. Таким образом, задача, стоящая перед физикохимиком, приобретает уже вполне разумные пределы (хотя она и не всегда выполнима).

Для белков и нуклеиновых кислот можно еще более упростить эту задачу. Чтобы описать относительное расположение двух соседних остатков в полипептидной цепи, достаточно задать два угла, а для описания ориентации каждой боковой цепи, вероятно, потребуются в среднем еще два параметра. В белке с мол. массой 30 000 содержится 300 аминокислотных остатков, т.е. необходимо определить около 1200 параметров. Для нуклеиновой кислоты той же массы потребуется всего 800 параметров.

Таблица 1

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ БИОПОЛИМЕРОВ

Метод	Тип получаемой информации										Ограничения, накладываемые постановкой опыта								
	Полная трехмерная структура	Подробная информация об упаковке субъединиц	Структура участков специфического связывания, расположение связей	Расстояние между участками специфического связывания	Ориентация элементов вторичной структуры	Тип и относительное количество элементов вторичной структуры	Молекулярная масса	Форма, топология	Гибкость (степень жесткости)	Ионизация отдельных остатков полимера	Степень связывания и участки связывания с малыми молекулами (лигандами)	Доступность боковых групп, их окружение	Необходимая чистота образца	Требуемый размер образца	Вариатбельность условий внутри образца	Трудоемкость проведения опыта	Необходимость знания первичной структуры	Возможность проведения кинетических измерений	
Дифракция рентгеновских лучей	3	3	2	2	3	3	3	3	—	1	2	2	—	—	—	—	—	—	—
	3	3	2	2	3	3	3	3	—	1	2	2	—	—	—	—	—	—	—
	1	2	—	1	—	—	1	3	1	—	—	—	—	3	—	2	3	—	—
	1	—	—	1	—	—	1	2	—	—	—	—	—	3	—	1	2	—	—
	2	—	—	—	—	—	1	2	1	—	—	—	—	3	—	—	2	—	—
	—	1	—	—	—	—	1	2	1	—	—	—	—	1	1	1	2	—	—
	—	—	3	1	—	—	—	1	1	—	2	—	—	1	2	2	1	2	—
	—	1	—	—	—	—	2	1	1	—	—	—	—	2	2	1	2	—	—
	—	1	—	—	—	—	2	1	1	—	—	—	—	1	2	2	2	—	—
	—	—	—	—	—	—	2	1	1	—	—	—	—	1	2	2	2	—	—
	—	—	—	—	—	—	2	1	1	—	—	—	—	1	2	2	2	—	—
	—	—	—	—	—	—	3	—	—	1	—	—	—	1	3	2	2	—	—

Измерения диффузии	—	—	—	—	2	1	—	—	—	1	2	—	2	—
Измерения вязкости	—	—	—	—	2	2	2	—	—	1	3	3	3	2
Гель-фильтрация	—	—	—	—	2	1	—	—	1	3	3	3	3	2
Поглощение света в области УФ — видимый свет	—	—	—	—	1	—	—	1	1	1	3	3	3	1
Линейный дихроизм, двойное лучепреломление	—	—	—	2	1	1	2	2	—	1	1	1	1	1
КД/ДОВ	—	1	—	—	2	—	—	1	2	1	3	3	3	1
Поглощение света в ИК- области	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	1	2	1
Дихроизм в ИК-области	—	—	—	2	1	—	—	—	—	—	1	1	1	—
МКД/МДОВ	—	2	—	—	—	—	—	1	—	—	1	3	3	1
Флуоресценция	—	—	2	—	—	—	—	1	1	1	3	3	3	1
Поляризованная флуоресценция	—	1	—	—	1	—	2	—	—	—	3	3	3	2
Фосфоресценция	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	3	3	—	2
Комбинационное рассеяние света	—	1	—	—	1	—	—	—	—	1	1	1	2	1
Резонансное комбинационное рассеяние	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	3	3	3	2
ЭПР	—	2	2	1	—	—	2	2	—	2	3	3	2	2
ЯМР- ¹ H	1	—	3	2	—	—	—	1	3	1	—	1	1	1
ЯМР- ¹³ C	—	—	2	1	—	—	—	2	2	—	—	2	—	2
³ H-изотопный обмен	—	1	—	—	2	—	1	—	—	1	1	2	2	1
Потенциометрическое титрование	—	1	—	—	—	—	—	2	1	—	1	—	1	1
Электрофорез	—	—	—	—	1	1	—	1	—	—	3	3	1	3
Фотоэлектронная спектроскопия	—	2	—	—	—	—	1	—	1	—	2	1	—	2
Эффект Мессбауэра	—	—	2	—	—	—	—	—	1	1	2	1	—	2

Примечание: большие цифры под рубрикой «Тип получаемой информации» указывают на большую эффективность метода, а прочерк означает, что данный метод для этой цели обычно не применяют; большие цифры под рубрикой «Ограничения, накладываемые постановкой опыта» указывают на большую легкость измерений или интерпретации данных, а прочерк указывает на большие экспериментальные трудности.

При наличии в молекуле той или иной симметрии, например идентичных субъединиц или протяженных спиральных участков, задача еще более упрощается. Все же, даже в наиболее благоприятных случаях, только один метод — дифракция рентгеновских лучей на монокристалле — может дать такое количество информации, которого достаточно для определения трехмерной структуры биополимера. Однако рентгеноструктурный анализ — это очень трудоемкий метод, применение которого связано с рядом ограничений. Получение с его помощью настолько хорошего качества данных, чтобы на их основе можно было найти точные координаты атомов, — скорее исключение, чем правило.

Многое из того, что нас интересует, мы можем успешно изучать и не зная точной пространственной структуры. В последующих главах будет много тому примеров. Чтобы получить ответ на тот или иной вопрос, необходимо упростить задачу. Это можно сделать двумя способами. Суть первого заключается в том, чтобы рассматривать систему не на уровне атомного разрешения, а с гораздо меньшей точностью. Наиболее простыми являются те методы, с помощью которых получают сведения об общих размерах и форме макромолекулы. Для многих из них не имеют значения детали молекулярной структуры. Макромолекулу при этом представляют в виде эллипсоида вращения, в виде клубка, нить которого характеризуется некоторой постоянной жесткостью или не обладает таковой вовсе, в виде стержня или других простых форм. В эту категорию попадает большая часть гидродинамических методов и некоторые методы, основанные на рассеянии.

Суть другого способа заключается в том, что исследуется лишь малая часть макромолекулы. В некоторых случаях точность методов, с помощью которых это делается, равна точности метода дифракции рентгеновских лучей (а иногда и превышает ее). При этом жертвуют целостным представлением о всей структуре. Обычно в методах этой группы используют в качестве зонда молекулы, свойства которых позволяют отличить их от остальной части системы. Иногда они являются частью самой макромолекулы, в других случаях их вводят в систему извне. В принципе с помощью многочисленных зондов можно было бы картировать большую часть структуры. На практике, однако, предпочитают концентрировать усилия лишь на некоторых вполне определенных участках. Их выбирают или потому, что они представляют биологический интерес, или же из соображений удобства (т.е. либо зонд является природным соединением, либо его легко можно ввести в систему). Примерами таких плодотворных и широко распространенных зондирующих методов служат люминесценция, ЭПР, некоторые приложения ЯМР и метод химических модификаций.

Между этими двумя крайними случаями находятся методы, позволяющие избирательно исследовать лишь некоторые общие структурные характеристики, игнорируя все остальные. С помощью этих методов получают некую общую картину, которая может накладывать серьезные ограничения на вероятную пространственную структуру. Очень часто информацию такого рода получают относительно областей упорядоченной вторичной структуры. Такие экспериментальные методы, как КД/ДОВ, спектроскопия в УФ- и ИК-областях и рамановская спектроскопия, а также тритиевый изотопный обмен позволяют получить разумные оценки количества спиральных участков в молекуле белка или нуклеиновой кислоты. Иногда можно получить при этом некоторые сведения относительно типа, размеров и химического состава спиральных участков. Вместе с тем ни один из этих методов не дает возможности определить всю пространственную структуру, но в ряде случаев они позволяют получить довольно ясную, хотя и приблизительную, картину при относительно небольших затратах усилий и времени.

Эффективность практически каждого из методов, которые имеются в арсенале биофизхимика, возрастает, если наряду с ним используют и другие методы. Есть много примеров тому, как в результате параллельных исследований, объектом которых являлась одна и та же макромолекула, с помощью различных подходов удавалось получить богатую и подробную информацию об этом объекте. Но таким способом никогда еще не удавалось собрать достаточное количество данных, которое позволило бы получить полную статическую картину структуры молекулы, — это может дать лишь рентгеноструктурный анализ. Однако эти методы дали много сведений, получить которые с помощью одного рентгеноструктурного анализа можно лишь при стечении благоприятных обстоятельств и при определенных допущениях. В табл. 1 сопоставлены некоторые основные характеристики всех описываемых здесь методов. Совершенно ясно, что подробное рассмотрение принципов, на которые опирается каждый метод, и результатов, полученных с его помощью, не может втесниться в рамки одного пособия. Мы рассмотрим здесь лишь около половины этих методов. Но даже и при таком сокращении оставшийся материал изложен далеко не исчерпывающим образом. Главная тема настоящей книги — молекулы, а не методы. Практическая сторона применения методов будет рассматриваться подробно только тогда, когда это будет абсолютно необходимо для понимания смысла измеряемых величин. По каждому из описываемых в данном томе методов имеется много статей и пособий. И читателю, который решит использовать тот или иной метод, скорее всего, придется обратиться за дополнительной консультацией к какому-либо из них.

7.1. Основные принципы

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Идея всякого спектроскопического эксперимента чрезвычайно проста. Электромагнитное излучение с длиной волны λ (или частотой $\nu = c/\lambda$) направляют на образец и определяют какие-либо параметры излучения, исходящего из образца. Одним из простейших таких параметров является доля потока излучения, поглощенная или рассеянная образцом (на этом принципе основаны спектроскопические методы, некоторые методы ЯМР-спектроскопии, а также разнообразные измерения упругого рассеяния). Кроме того, можно исследовать излучение образца, характеризующееся иной частотой, чем частота падающего света (примерами могут служить флуоресценция, фосфоресценция, спектроскопия комбинационного рассеяния и неупругое рассеяние света). Помимо интенсивности излучения как таковой исследуют также ее распределение по частотам. В более сложных методах измеряют, кроме того, поляризацию излучения (КД, ДОВ и поляризационная флуоресценция).

Диапазон длин волн, используемых при спектроскопических исследованиях биологических молекул, весьма широк. Он представлен в табл. 7.1, где указана также энергия квантов соответствующих длин волн. Значения энергии лежат в диапазоне от нескольких миллионов $\text{ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$ (что более чем достаточно для разрыва самых прочных ковалентных связей при условии, что эту энергию удастся локализовать в нужном месте) до значений, меньших $10^{-3} \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$ (что заметно уступает тепловой энергии при комнатной температуре, $RT = 0,6 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$).

При более внимательном рассмотрении оказывается, что измерения в каждой из этих спектральных областей сопряжены с большими экспериментальными трудностями, разными для разных методов. Это обусловлено значительными различиями аспектов молекулярной структуры, изучаемых тем или иным методом, а также широким разнообразием экспериментальных подходов. В то же время, как будет видно из дальнейшего, все спектральные методы имеют много общего.

КАЧЕСТВЕННОЕ ОПИСАНИЕ СПЕКТРОСКОПИИ

Объяснить наглядно механизм взаимодействия света с веществом вряд ли возможно. Свет — это быстро осциллирующее электромагнитное поле, а молекулы можно представить в виде распределения зарядов и спинов, которые обладают определенными электрическими и магнитными свойствами. Под действием света это распределение может изменяться. В типичном спектроскопическом эксперименте свет падает на образец либо непрерывно, либо импульсами. В круг задач спектроскопии входит выяснение вопросов о том, как *быстро* молекула реагирует на электромагнитное возмущение и почему изменения в состоянии молекулы вызывает лишь свет с вполне определенными значениями длин волн; кроме того, спектроскопические исследования ставят своей целью выяснить, какие изменения претерпевает излучение при взаимодействии с образцом.

Таблица 7.1

СПЕКТРАЛЬНАЯ ОБЛАСТЬ, ИСПОЛЬЗУЕМАЯ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ

Характерная длина волны, см	Характерная энергия, ккал · моль ⁻¹	Вид излучения	Метод
10^{-11}	$3 \cdot 10^8$	γ -Излучение	Мёссбауэровская спектроскопия
10^{-8}	$3 \cdot 10^5$	Рентгеновское излучение	Рассеяние и дифракция рентгеновских лучей
10^{-5}	$3 \cdot 10^2$	Вакуумное ультрафиолетовое излучение	Электронные спектры
$3 \cdot 10^{-5}$	10^2	Ближнее ультрафиолетовое излучение	Электронные спектры
	Энергия углерод- углеродной связи		
$6 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^3$	Видимый свет	Электронные спектры
10^{-3}	$3 \cdot 10^0$	Инфракрасный свет	Колебательные спектры
	RT при комнатной температуре		
10^{-2}	$3 \cdot 10^{-1}$	Свет в дальней инфракрасной области	Колебательные спектры
10^{-1}	$3 \cdot 10^{-2}$	Микроволновое излучение	Вращательные спектры
10^0	$3 \cdot 10^{-3}$	Микроволновое излучение	ЭПР
10	$3 \cdot 10^{-4}$	Излучение в радиочастотном диапазоне	ЯМР

КВАНТОМЕХАНИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ СВОЙСТВ

Наиболее адекватное описание механизмов перехода молекулы из одного разрешенного энергетического состояния в другое, а также самих этих состояний дает квантовая механика. Эта теория составляет сегодня основу нашего понимания строения молекул. Для тех читателей, которые в какой-то мере уже знакомы с квантовой механикой, последующее краткое введение послужит и для повторения, и для усвоения системы обозначений, используемой в дальнейшем в этой главе. Остальные читатели смогут ознакомиться по крайней мере с основными понятиями и терминологией. Этим читателям, возможно, не стоит особенно углубляться в математические дебри; конечно, язык математики широко используется в квантовой механике, но мы будем прибегать к нему не очень часто. Тем не менее ряд ключевых положений квантовой механики должен быть твердо усвоен.

1. Состояние системы (атома, молекулы, кристалла) описывается волновой функцией.
2. Наблюдаемой величине (энергии, дипольному моменту, положению в пространстве) отвечает определенный математический оператор.

3. Значение данной величины (например, энергии) в некотором состоянии системы вычисляется как среднее значение соответствующего оператора в этом состоянии.

4. Переход между двумя состояниями системы может быть вызван возмущением, мерой которого также служит некоторый оператор. Вероятность перехода тем выше, чем более начальное состояние под действием возмущения становится «похожим» на конечное.

5. Способность света вызывать переходы в молекулах можно оценить на основании его способности индуцировать осциллирующие дипольные моменты.

6. Преимущественные направления наведенного дипольного момента определяются геометрией молекулы и являются фиксированными относительно внутримолекулярной системы координат.

ОПИСАНИЕ СОСТОЯНИЯ МОЛЕКУЛЫ ПРИ ПОМОЩИ ВОЛНОВОЙ ФУНКЦИИ

Состояние молекулы, как и любой другой системы, описывается волновой функцией Ψ . Обычно Ψ зависит от пространственных координат и спинов всех электронов и ядер, а также от присутствия внешних полей. Она является комплексной величиной и зависит от времени. Волновую функцию нельзя непосредственно измерить. Она связана с вероятностью обнаружить систему в той или иной точке пространства, с тем или иным спином и т.д., и поэтому ее часто называют амплитудой вероятности.

Вероятность того, что система находится в определенной точке пространства или имеет определенный спин, равна квадрату абсолютного значения Ψ при данных значениях координат или спина. Поскольку Ψ является комплексной величиной, а вероятность — действительной, процедура нахождения вероятности состоит в умножении Ψ на комплексно сопряженную функцию ¹⁾ Ψ^* :

$$P = \Psi^* \Psi \quad (7.1)$$

Так как система обязательно должна где-то находиться, равно как и обладать каким-то спином, величина P является нормированной, т.е. интеграл от нее по всему пространству координат и спинов, совокупность которых мы для краткости обозначим через τ , должен быть равен единице:

$$\int P d\tau = \int \Psi^* \Psi d\tau = \langle \Psi | \Psi \rangle = 1 \quad (7.2)$$

Мы ввели здесь обозначения Дирака — угловые скобки, которые символизируют интегрирование, причем первая из функций берется в комплексно сопряженной форме.

Рассмотрим систему, которая может находиться в одном из двух возможных состояний, a или b , описываемых волновыми функциями Ψ_a и Ψ_b . Если система с достоверностью находится в состоянии a , то вероятность обнаружить ее там равна единице и, согласно уравнению (7.2), $\langle \Psi_a | \Psi_a \rangle = 1$. Аналогично, если система пребывает в состоянии b , $\langle \Psi_b | \Psi_b \rangle = 1$. Эти соотношения называются нормировочными, а волновые функции, которые удовлетворяют условию нормировки, — нормированными.

Мерой близости двух состояний служит интеграл $\langle \Psi_a | \Psi_b \rangle$, который иногда называют интегралом перекрытия. Он является безразмерной величиной и представляет собой проекцию состояния b на состояние a . Если состояния a и b рассматривать как векторы, то $\langle \Psi_a | \Psi_b \rangle$ служит аналогом скалярного произведения $\mathbf{a} \cdot \mathbf{b}$, которое достигает своего

¹⁾ Как и всякую комплексную величину, Ψ можно представить в виде $a + ib$, где a и b — действительные числа, а $i = \sqrt{-1}$. Тогда комплексно сопряженная функция $\Psi^* = a - ib$ и вероятность $\Psi^* \Psi = a^2 + b^2$.

максимального значения при a , тождественно равном b : $\langle \Psi_a | \Psi_b \rangle = 1$. Когда величина $\langle \Psi_a | \Psi_b \rangle$ оказывается равной нулю, говорят, что состояния a и b ортогональны (скалярное произведение ортогональных векторов также равно нулю).

Предположим, что имеются только два состояния, a и b , и точно неизвестно, в каком из них находится система. В этом случае система может быть описана линейной комбинацией двух волновых функций:

$$\Psi = C_a \Psi_a + C_b \Psi_b \quad (7.3)$$

Поскольку система с достоверностью находится либо в одном, либо в другом из этих состояний, $\langle \Psi | \Psi \rangle = 1$. Коэффициенты C_a и C_b определяют вероятности того, что систему можно обнаружить в соответствующем состоянии¹⁾. В частном случае, который приложим ко всем интересующим нас системам, где $\langle \Psi_a | \Psi_b \rangle = 1$ и $\langle \Psi_a | \Psi_b \rangle = 0$, вероятности того, что система находится в состоянии a , определяется следующим соотношением:

$$P_a = C_a^* C_a = |C_a|^2 \quad (7.4)$$

Часто имеет смысл разделить переменные, описывающие различные свойства системы, например ее спиновые (s) и пространственные (r) координаты. В этом случае волновую функцию следует записывать в виде произведения двух функций: $\Psi(r, s) = \Psi(r) \Psi(s)$. Если эти два набора переменных действительно независимы, такая форма записи является точным равенством. Однако во многих случаях подобный способ описания представляет собой лишь некое приближение. Так, например, при описании состояния молекул обычно стремятся выделить волновые функции электронов Ψ_e , характеризующие систему при некотором фиксированном положении ядер, и собственно волновые функции ядер Φ_N :

$$\Psi = \Psi_e(r, R) \Phi_N(R) \quad (7.5)$$

где r — совокупность электронных, а R — ядерных координат. Такой способ разделения называется приближением Борна—Оппенгеймера и широко используется в теории молекулярных спектров. В основе этого приближения лежит представление о том, что электроны движутся значительно быстрее ядер и потому для электронной волновой функции Ψ_e положение ядер может считаться *фиксированным*, а волновая функция ядер Φ_N отвечает некоторой *усредненной по времени* конфигурации электронов.

Сходным образом состояние двухэлектронной системы может быть описано волновой функцией, представленной как произведение двух одноэлектронных волновых функций:

$$\Psi = \Psi_1(r_1) \Psi_2(r_2) \quad (7.6)$$

при условии, что мы умеем отличать один электрон от другого и что электроны не взаимодействуют между собой.

¹⁾ В общем случае амплитуда вероятности обнаружить систему в состоянии a составляет $\Psi_a^* \langle \Psi_a | \Psi \rangle$, где интеграл $\langle \Psi_a | \Psi \rangle$ представляет собой число, характеризующее перекрытие функций Ψ и Ψ_a . Зная выражение для Ψ (7.3), можно по аналогии с (7.2) вычислить вероятность нахождения системы в состоянии a :

$$\langle \langle \Psi_a | \Psi \rangle \Psi_a^* | \Psi_a^* \langle \Psi_a | \Psi \rangle \rangle = \langle \Psi_a | \Psi_a \rangle |C_a \langle \Psi_a | \Psi_a \rangle + C_b \langle \Psi_a | \Psi_b \rangle|^2$$

Слагаемое, содержащее C_b , представляет собой интерференционный член, который обязан своим происхождением волновой природе квантовомеханических состояний (см. A. Messiah, Quantum Mechanics, vol. 1, New York, Wiley, 1962, pp. 296—298).

ОПЕРАТОРЫ И ЗНАЧЕНИЯ НАБЛЮДАЕМЫХ ВЕЛИЧИН

Данную систему можно характеризовать тем, к какому результату приводят различные математические операции, производимые над ее волновой функцией. Такой математической операцией может быть, например, тождественное преобразование $\hat{I}$. Его действие на волновую функцию дает эту же функцию: $\hat{I}\Psi = \Psi$. Другим примером может служить операция дифференцирования d/dx . Эти операции, а также $\sin$, $\sqrt{\quad}$ и многие другие математические действия называют операторами. Однако ни они сами, ни результат их действия на волновую функцию еще не являются наблюдаемыми физическими величинами.

Многие операторы, используемые в квантовой механике, удовлетворяют уравнению для нахождения собственных значений

$$\hat{Q}\Psi = \Lambda\Psi \quad (7.7)$$

Здесь Λ — число, называемое собственным значением. Состояние, описываемое волновой функцией Ψ , которая удовлетворяет этому уравнению, называется собственным состоянием (а соответствующая функция — собственной) оператора $\hat{Q}$ с собственным значением Λ . Смысл величины Λ легче всего понять, вычисляя среднее значение оператора. Для операторов, которые отвечают наблюдаемым физическим величинам, среднее значение определяется по аналогии с уравнением (7.2):

$$\langle O \rangle = \int \Psi^* \hat{Q} \Psi d\tau = \langle \Psi | \hat{Q} | \Psi \rangle \quad (7.8)$$

Делая соответствующую подстановку с помощью уравнения (7.7) и используя соотношение (7.2), получаем

$$\langle O \rangle = \langle \Psi | \Lambda | \Psi \rangle = \Lambda \quad (7.9)$$

Итак, если система пребывает в состоянии Ψ , удовлетворяющем уравнению (7.7), то величина Λ есть не что иное, как результат измерения физической величины, которая отвечает оператору $\hat{Q}$.

Например, оператор импульса $\hat{p} = -i\hbar\nabla$ (или в одномерном случае $-i\hbar d/dx$), где $i = \sqrt{-1}$, а $\hbar$ — постоянная Планка, деленная на 2π . Импульс системы вычисляется как $\langle \Psi | \hat{p} | \Psi \rangle$. Другими примерами операторов могут служить оператор пространственных координат $\hat{r}$ и оператор дипольного момента $e\hat{r}$ (где e — заряд электрона).

УРАВНЕНИЕ ШРЕДИНГЕРА

Изменения, происходящие в системе с течением времени, описываются уравнением, имеющим обманчиво простой вид:

$$i\hbar d\Psi/dt = \hat{H}\Psi \quad (7.10.)$$

В этом зависящем от времени уравнении Шредингера $\hat{H}$ — так называемый оператор Гамильтона, или гамильтониан системы. Он определяется следующим образом:

$$\langle \Psi | \hat{H} | \Psi \rangle = E \quad (7.11)$$

где E — полная энергия системы. В общем случае $\hat{H}$ можно записать в виде суммы $\hat{T} + \hat{V}$, где $\hat{T}$ — оператор кинетической энергии, а $\hat{V}$ — оператор потенциальной энергии. Оператор $\hat{T}$ может быть получен из соответствующего соотношения классической механики. В классической механике кинетическая энергия выражается как

$$\sum_i \frac{1}{2} m_i v_i^2 = \sum_i p_i^2 / 2m_i$$

где суммирование проводится по массам (m_i) и скоростям (v_i) или импульсам (p_i) всех частиц системы. В квантовой механике $\underline{T} = \sum_i \underline{p}_i^2/2m$, где $\underline{p}_i^2 = -\hbar^2 \nabla_i^2$. Вид оператора $\underline{V}$ зависит от конкретной задачи. Сюда входят взаимодействия между электронами и ядрами молекул системы, а также взаимодействия этих частиц с внешними полями.

Рассмотрим частный случай, когда $\underline{H}$ сам по себе не зависит от времени. Волновые функции, описывающие определенные состояния системы, будут удовлетворять уравнению

$$\underline{H}\Psi = E\Psi \quad (7.12)$$

Оно называется стационарным уравнением Шредингера. Волновые функции, удовлетворяющие этому уравнению, обладают рядом интересных свойств. Энергия соответствующих состояний [согласно уравнению (7.7)] равна E и не зависит от времени. Однако волновые функции Ψ остаются зависящими от времени. Делая соответствующую подстановку из (7.12) в (7.10), получаем

$$i\hbar d\Psi/dt = E\Psi \quad (7.13)$$

Это простое дифференциальное уравнение первого порядка легко проинтегрировать:

$$\Psi(t) = \Psi(0)e^{-iEt/\hbar} \quad (7.14)$$

где $\Psi(0)$ — волновая функция состояния системы в момент времени $t = 0$. Соответствующая вероятность не зависит от времени:

$$P = \Psi^*(t)\Psi(t) = |\Psi(0)|^2 e^{-iEt/\hbar} e^{+iEt/\hbar} = |\Psi(0)|^2$$

Таким образом, любое собственное состояние, волновая функция которого Ψ удовлетворяет уравнению (7.12), является *стационарным состоянием* системы. Его наблюдаемые свойства не меняются с течением времени.

Другим важным свойством функций, удовлетворяющих уравнению (7.12), является ортонормированность. Если Ψ_1 и Ψ_2 представляют собой собственные состояния с энергиями E_1 и E_2 , то в самом общем случае можно показать, что

$$\langle \Psi_1 | \Psi_2 \rangle = \langle \Psi_2 | \Psi_1 \rangle = 0 \quad (7.15)$$

при $E_1 \neq E_2$.

Рассмотрим систему, которая может находиться либо в состоянии 1, либо в состоянии 2. Ее волновая функция, согласно уравнению (7.3), имеет вид $\Psi = C_1\Psi_1 + C_2\Psi_2$. Предположим, что мы производим измерение с целью выяснить, находится ли система в состоянии 1. Согласно уравнению (7.4), вероятность обнаружить систему в этом состоянии равна

$$|\langle \Psi_1 | \Psi \rangle|^2 = |C_1|^2 \quad (7.16.)$$

при условии, что Ψ_1 — нормированная функция. Заметим, что этот результат не зависит ни от каких свойств состояния 2. Таким образом, состояния, волновые функции которых удовлетворяют уравнению (7.12), являются *наблюдаемыми состояниями* системы с заданными энергией и другими параметрами¹⁾.

¹⁾ Несмотря на это, собственная функция оператора, например $\underline{H}$, не обязательно является собственной функцией другого оператора. Для выяснения этого вопроса определяют, коммутируют или нет два данных оператора. Например, гамильтониан $\underline{H}$ и оператор момента импульса $\underline{L}$ независимо от последовательности их воздействия на некоторую собственную волновую функцию дают одинаковый результат: $\underline{H}\underline{L}\Psi = \underline{L}\underline{H}\Psi$. Это означает, что существуют такие волновые функции, которые одновременно являются собственными как для $\underline{H}$, так и для $\underline{L}$. Таким образом, для системы в состоянии Ψ можно одновременно определить и энергию, и момент импульса. Напротив, операторы координат и импульса не коммутируют: $\underline{r}\underline{p}\Psi \neq \underline{p}\underline{r}\Psi$, поэтому нельзя одновременно определить точное местоположение молекулы и ее импульс. Это утверждение носит название принципа неопределенности Гейзенберга.

Функции, удовлетворяющие уравнению (7.12), образуют полный набор. Это означает, что любое состояние системы может быть описано при помощи линейной комбинации собственных функций

$$\Psi = \sum_i C_i \Psi_i \quad (7.17)$$

Вообще говоря, суммирование следует проводить по всем состояниям. Это может быть бесконечный ряд. На практике, однако, во многих случаях большинство членов достаточно мало. Предположим, что система, исходяно находящаяся в состоянии 2, подвергается малому возмущению. Результирующее состояние будет описываться уравнением (7.17), в котором C_a близко к единице и лишь небольшое число других коэффициентов C_i имеет конечные значения. Это утверждение составляет основу теории возмущений, которая применяется для описания ответа молекулы на воздействие слабых электромагнитных полей или на слабые воздействия со стороны других молекул.

Пусть возмущение представляет собой потенциал $\underline{V}$. Можно сказать, что этот потенциал вызывает примешивание других состояний к исходному состоянию a , в результате чего система переходит в конечное состояние с волновой функцией Ψ . Эффект смешивания можно оценить, вычислив интеграл

$$\langle \Psi | \underline{V} | \Psi_a \rangle = \sum_i C_i \langle \Psi_i | \underline{V} | \Psi_a \rangle \quad (7.18)$$

В отсутствие возмущения $\underline{V}$ все слагаемые в правой части уравнения (7.18), за исключением $\langle \Psi_a | \Psi_a \rangle$, равны нулю, поскольку состояния i ортогональны. Наличие $\underline{V}$ делает ненулевыми и другие слагаемые. Таким образом, потенциал может вызывать переходы между состоянием a и другими состояниями. Действие оператора $\underline{V}$ на функцию Ψ_a отражает возможность превращения соответствующего состояния в другие. Амплитуда вероятности таких превращений определяется как $\langle \Psi_i | \underline{V} | \Psi_a \rangle$.

● ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СВЕТА С МОЛЕКУЛОЙ

Чтобы объяснить результаты спектроскопических измерений, необходимо рассмотреть задачу о взаимодействии света с молекулой. Для простоты мы ограничимся рассмотрением только электрической составляющей световой волны, хотя при более строгом описании необходимо учитывать воздействие и магнитного поля. Свет представляет собой поперечную волну, совершающую периодические колебания во времени и в пространстве¹⁾. Типичный хромофор (химическая группа, взаимодействующая со световой волной) мал ($\approx 10 \text{ \AA}$) по сравнению с длиной волны ($\approx 3000 \text{ \AA}$). Таким образом, различиями в параметрах электрического поля световой волны, падающей на разные точки молекулы, можно пренебречь. Уравнение для напряженности электрического поля, действующего на молекулу, имеет вид

$$E(t) = E_0 e^{i\omega t} \quad (7.19)$$

где E_0 — амплитуда; этот вектор указывает направление поляризации света. Круговая частота ω равна $2\pi\nu = 2\pi c/\lambda$, где ν — частота колебаний, выраженная в герцах.

Предположим, что наша система исходяно находится в состоянии с энергией E_a , описываемом собственной функцией Ψ_a не зависящего от времени гамильтониана $\hat{H}$. Подвергаясь в течение некоторого времени действию света, система испытывает возмущение, в результате которого часть молекул переходит из состояния a в другие состояния, как об этом говорилось выше для общего случая. Нам необходимо найти *скорость* вызываемых

¹⁾ Более детально свойства электромагнитного излучения будут описаны ниже в этой главе, а также в гл. 13.

светом переходов из состояния a в другие состояния. Чтобы упростить задачу, рассмотрим молекулу, которая может находиться только в двух состояниях, a и b . Поскольку взаимодействие со световой волной зависит от времени, нам придется решать нестационарное уравнение Шредингера. Гамильтониан можно записать в виде

$$\hat{H}' = \hat{H} + \hat{V}(t) \quad (7.20)$$

где действие света описывается членом $\hat{V}(t)$. В отсутствие света поведение во времени обоих состояний описывается уравнением (7.14). Волновые функции в присутствии света должны быть линейными комбинациями волновых функций для этих двух состояний, но теперь коэффициенты C_a и C_b зависят от времени:

$$\Psi(t) = C_a(t)\Psi_a e^{-iE_a t/\hbar} + C_b(t)\Psi_b e^{-iE_b t/\hbar} \quad (7.21)$$

Подставив это выражение в нестационарное уравнение Шредингера (7.10), после взаимного уничтожения нескольких членов получим

$$i\hbar(\Psi_a e^{-iE_a t/\hbar} dC_a/dt + \Psi_b e^{-iE_b t/\hbar} dC_b/dt) = \hat{V}(t)[\Psi_a e^{-iE_a t/\hbar} C_a(t) + \Psi_b e^{-iE_b t/\hbar} C_b(t)] \quad (7.22)$$

Чтобы вывести уравнения для нахождения $C_a(t)$ и $C_b(t)$, умножим обе части (7.22) на $\Psi_a^* e^{+iE_a t/\hbar}$ и проинтегрируем полученное равенство по пространственным координатам. Затем сделаем то же самое, умножив (7.22) на $\Psi_b^* e^{+iE_b t/\hbar}$

$$i\hbar dC_a/dt = \langle \Psi_a | \hat{V} | \Psi_a \rangle C_a + \langle \Psi_a | \hat{V} | \Psi_b \rangle C_b e^{-i(E_b - E_a)t/\hbar} \quad (7.23a)$$

$$i\hbar dC_b/dt = \langle \Psi_b | \hat{V} | \Psi_a \rangle C_a e^{-i(E_a - E_b)t/\hbar} + \langle \Psi_b | \hat{V} | \Psi_b \rangle C_b \quad (7.23b)$$

Уравнения (7.23 а, б) образуют систему из двух уравнений с двумя неизвестными. Для ее решения необходимо либо сделать некоторые предположения о начальных значениях C_a и C_b , либо воспользоваться точным выражением для возмущающего потенциала $\hat{V}(t)$. В большинстве учебников по квантовой механике приводится первый способ. Мы здесь проиллюстрируем второй подход.

Возмущение молекулы под действием света происходит из-за перераспределения ее электрических зарядов под действием осциллирующего электрического поля $\mathbf{E}$. Чтобы описать распределение зарядов в молекуле, мы могли бы рассмотреть каждый из этих зарядов по отдельности, однако проще воспользоваться разложением в ряд по мультипольным моментам (как мы это делали в гл. 5 при описании межмолекулярных взаимодействий). Для электронейтральной молекулы старшим в этом разложении будет дипольный член. В квантовой механике ему отвечает оператор $\hat{\mu} = \sum_i e_i \hat{\mathbf{r}}_i$, где суммирование производится по всем электронам, находящимся в точках $\hat{\mathbf{r}}_i$. Мы ограничимся рассмотрением электронной части волновой функции, описываемой уравнением (7.5). Положения ядер считаются фиксированными, поэтому их вклад в перераспределение электрического заряда равен нулю.

Энергия взаимодействия света с молекулой дается выражением $\hat{V}(t) = \hat{\mu} \mathbf{E}_0 e^{i\omega t}$. Чтобы не загромождать дальнейшие выкладки, будем считать, что постоянный дипольный момент молекулы в обоих состояниях a и b равен нулю, т.е. $\langle \Psi_a | \hat{\mu} | \Psi_a \rangle = \langle \Psi_b | \hat{\mu} | \Psi_b \rangle = 0$. Уравнения (7.23 а,б) приобретают теперь следующий вид:

$$i\hbar dC_a/dt = C_b \langle \Psi_a | \hat{\mu} | \Psi_b \rangle \cdot E_0 e^{-i(E_b/\hbar - E_a/\hbar - \omega)t} \quad (7.24 а)$$

$$i\hbar dC_b/dt = C_a \langle \Psi_b | \hat{\mu} | \Psi_a \rangle \cdot E_0 e^{-i(E_a/\hbar - E_b/\hbar - \omega)t} \quad (7.24 б)$$

где E_0 вынесена из-под знака интеграла, так как мы считаем ее постоянной для всей молекулы. (Заметим, что $\langle \Psi_a | \underline{\mu} | \Psi_b \rangle = \langle \Psi_b | \underline{\mu} | \Psi_a \rangle$.)

Эти два уравнения могут быть теперь решены одновременно¹⁾. Найдем вероятность P_b того, что система в момент времени t окажется в состоянии b . Согласно уравнению (7.4), $P_b = |C_b(t)|^2$. При условии, что E_0 мала, а $|C_b(0)|^2 = 0$, получаем

$$|C_b(t)|^2 = \frac{|\langle \Psi_b | \underline{\mu} | \Psi_a \rangle \cdot E_0|^2 t^2 \sin^2[(E_b/\hbar - E_a/\hbar - \omega)t/2]}{\hbar^2 2[(E_b/\hbar - E_a/\hbar - \omega)t/2]^2} \quad (7.25)$$

Видно, что вероятность $|C_b(t)|^2$ велика, лишь когда знаменатель $(E_b/\hbar - E_a/\hbar - \omega)$ мал. Это означает, что переходы между состояниями a и b наиболее вероятны, когда разность энергий $E_b - E_a$ близка к энергии кванта $\hbar\omega$:

$$h\nu = \hbar\omega = E_b - E_a \quad (7.26)$$

Иными словами, спектральные полосы (поглощение света или индуцированные светом переходы) будут проявляться в определенных узких интервалах длин волн (или частот).

Нам необходимо также знать скорость переходов молекулы из состояния a в состояние b под действием света. Эта скорость в точности равна скорости изменения $|C_b(t)|^2$ в ответ на облучение светом с частотой ν и близкими к ней частотами. Если интервал частот достаточно мал, то можно показать, что для поляризованного света и ориентированных молекул

$$\frac{dP_b}{dt} = \frac{d}{dt} \int d\nu |C_b(t)|^2 = \frac{1}{2\hbar^2} |\langle \Psi_b | \underline{\mu} | \Psi_a \rangle \cdot E_0|^2 \quad (7.27)$$

Аналогичное выражение получается для скорости индуцированных светом переходов $b \rightarrow a$.

Чтобы вычислить интенсивность поглощения света, мы должны знать скорость поглощения энергии падающего светового пучка. Скорость перехода можно представить в виде произведения двух сомножителей:

$$dP_b/dt = B_{ab}I(\nu) \quad (7.28)$$

где B_{ab} — скорость перехода, отвечающая единице плотности энергии излучения, а $I(\nu)$ — плотность энергии, падающей на образец при частоте ν . Из теории электричества и магнетизма известно, что плотность энергии света $I(\nu) = |E_0|^2/4\pi$. Уравнение (7.27) получено для ориентированных молекул, освещаемых поляризованным светом. Для растворов необходимо произвести усреднение по всем ориентациям. Для величины $|\langle \Psi_b | \underline{\mu} | \Psi_a \rangle \cdot E_0|^2$ это усреднение дает $(1/3)|\langle \Psi_b | \underline{\mu} | \Psi_a \rangle|^2 |E_0|^2$, поскольку приходится усреднять всевозможные значения $\cos^2\theta$, где θ — угол между векторами $\underline{\mu}$ и E_0 . Используя этот результат и уравнения (7.27) и (7.28), получим для B_{ab} :

$$B_{ab} = (2/3)(\pi/\hbar^2) |\langle \Psi_b | \underline{\mu} | \Psi_a \rangle|^2 \quad (7.29)$$

Скорость, с которой поглощается световая энергия, будет зависеть от числа вызываемых светом переходов $a \rightarrow b$, сопровождающихся поглощением света, от числа переходов $b \rightarrow a$, в ходе которых происходит испускание света, и от энергии перехода ($E_b - E_a = h\nu$). Используя уравнение (7.28), находим

$$-dI(\nu)/dt = h\nu(N_a B_{ab} - N_b B_{ba})I(\nu) \quad (7.30)$$

¹⁾ Это решение довольно сложное; см. Eyring et al., 1946. [Имеется перевод: Эйринг Г., Уолтер Дж., Кимбалл Дж. Квантовая химия. Пер. с англ. — М.: ИЛ, 1948.]

где N_a и N_b — число молекул в 1 см^3 , находящихся в состояниях a и b соответственно. Таким образом, поглощение света (как и другие оптические свойства) зависит от концентрации.

Величины B_{ab} и B_{ba} называются коэффициентами Эйнштейна для вынужденного поглощения и излучения соответственно. В простых случаях, таких, как описанная здесь система с двумя уровнями, $B_{ab} = B_{ba}$.

МОМЕНТ ПЕРЕХОДА

Молекулярный параметр, который определяет вероятность перехода B_{ab} (и, следовательно, интенсивность поглощения света), пропорционален $\langle \Psi_b | \underline{\mu} | \Psi_a \rangle$. Этот интеграл описывает способность света воздействовать на молекулу в состоянии a так, что она приобретает свойства, характерные для состояния b . Классическая трактовка взаимодействия света с веществом основана на рассмотрении индуцированных электрическим полем световой волны диполей

$$\mu_{\text{инд}} = \alpha \cdot E \quad (7.31)$$

где α — поляризуемость, а $\mu_{\text{инд}}$ — индуцированный дипольный момент. Поскольку зависимость E от времени носит колебательный характер, то же можно сказать и о $\mu_{\text{инд}}$. Квантовомеханическим аналогом этой величины является матричный элемент $\langle \Psi_b | \underline{\mu} | \Psi_a \rangle$. Эту величину называют моментом перехода (Дополнение 7.1) и обозначают μ_{ba} . Для ее нахождения надо вычислить интеграл $\int \Psi_b^* \underline{\mu} \Psi_a d\tau$. Момент каждого данного перехода ориентирован относительно осей молекулы вполне определенным образом. Его можно изобразить в виде вектора в системе координат, задаваемой положениями атомных ядер, и, следовательно, определить компоненты вектора μ_{ba} в этой системе координат, μ_x , μ_y и μ_z .

ПАРАМЕТРЫ, КОТОРЫЕ МОЖНО ОПРЕДЕЛИТЬ ИЗ СПЕКТРАЛЬНЫХ ДАННЫХ

Мерой разности энергий двух состояний служит длина волны света или частота, при которой наблюдается максимальное поглощение [уравнение (7.26)]. Полоса поглощения изолированной молекулы, согласно уравнению (7.25), в принципе должна быть очень узкой, однако в действительности целый ряд факторов приводит к ее уширению. Важнейшими среди них являются влияние окружения, неоднородность состояний и молекулярное движение.

Дополнение 7.1.

ВОЛНОВЫЕ ФУНКЦИИ КАК ВЕКТОРЫ И ОПЕРАТОРЫ КАК МАТРИЦЫ

Волновая функция Ψ , описывающая какое-то состояние системы, может быть выражена в виде линейной комбинации $\Psi = \sum C_i \Psi_i$, где каждая волновая функция Ψ_i является собственной функцией некоторого оператора. Если система функций Ψ_i является полной, то волновая функция любого состояния может быть описана в системе координат, базисными векторами которой являются функции Ψ_i . Поэтому функцию Ψ можно рассматривать как вектор, компонентами которого в этой системе координат служат числа $C_1, C_2, \dots, C_i, \dots$. Результат действия оператора $\hat{Q}$ на любое состояние можно, таким образом, найти, рассматривая его действие на каждую из базисных волновых функций.

Например, $\hat{Q}\Psi = \sum_i C_i \hat{Q}\Psi_i$. Результат действия оператора на различные базисные функции может быть представлен в виде матрицы, элементами которой являются интегралы $O_{ij} = \langle \Psi_i | \hat{Q} | \Psi_j \rangle$. Эта матрица имеет вид

$$\begin{pmatrix} O_{11} & O_{12} & O_{13} & \cdots \\ O_{21} & O_{22} & O_{23} & \cdots \\ O_{31} & O_{32} & O_{33} & \cdots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots \end{pmatrix}$$

В частном случае, когда Ψ_i являются собственными функциями оператора $\hat{Q}$ с собственными значениями Λ_i , $\langle \Psi_i | \hat{Q} | \Psi_j \rangle = \Lambda_i$ при $i = j$ и $\langle \Psi_i | \hat{Q} | \Psi_j \rangle = 0$ при $i \neq j$. Следовательно, матрица приобретает диагональный вид:

$$\begin{pmatrix} \Lambda_1 & 0 & 0 & \cdots \\ 0 & \Lambda_2 & 0 & \cdots \\ 0 & 0 & \Lambda_3 & \cdots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots \end{pmatrix}$$

Этот аппарат применяется так часто, что интегралы вида $\langle \Psi_i | \hat{Q} | \Psi_j \rangle$ повсеместно называют *матричными элементами* оператора $\hat{Q}$ и используют для их обозначения символы O_{ij} . Например, уравнение (7.27) можно записать в виде

$$dP_b/dt = (1/2\hbar^2) |\mu_{ba} \cdot E_0|^2$$

где под μ_{ba} теперь следует понимать матричный элемент оператора дипольного момента.

Интенсивность поглощения (или излучения), связанного с данным переходом, описывается уравнениями (7.27)—(7.29). Измеряя интенсивность, можно оценить величину $|\langle \Psi_b | \hat{\mu} | \Psi_a \rangle|^2$, которая в свою очередь несет информацию о распределении электронов в молекуле. Интенсивность зависит от взаимной ориентации молекулы и направления поляризации света $\langle \Psi_b | \hat{\mu} | \Psi_a \rangle \cdot E_0$. Таким образом, в случае ориентированных молекул можно получить некоторые данные относительно геометрии системы.

Величина индуцированного светом момента перехода $\langle \Psi_b | \hat{\mu} | \Psi_a \rangle$ осциллирует вместе с приложенным электрическим полем. Таким образом, в отличие от постоянного вектора $\langle \Psi_b | \hat{\mu} | \Psi_a \rangle$ обладает лишь определенной ориентацией, но не направлением, поэтому иногда ее помечают знаком $\leftrightarrow$, а не просто стрелкой, используемой для обозначения векторов. При одновременном возбуждении двух диполей важное значение приобретает их относительная фаза. В зависимости от свойств системы диполи могут возбуждаться в фазе, в противофазе или с некоторой произвольной разностью фаз. Например,

	В фазе	В противофазе
Время = t	$\uparrow \uparrow$	$\uparrow \downarrow$
Время = $t + 1/2\nu$	$\downarrow \downarrow$	$\downarrow \uparrow$

Этот эффект становится важным при рассмотрении оптических свойств молекул, обладающих более чем одним хромофором. Диполи, индуцированные светом в одном хромофоре, могут взаимодействовать с индуцированными диполями соседних хромофоров. В за-

висимости от разности фаз и взаимной ориентации диполей эти взаимодействия могут приобретать характер либо притяжения (как это имеет место в упомянутом случае противоположных фаз), либо отталкивания.

7.2. Спектроскопия поглощения в области электронных переходов

Среди измерений, производимых при исследовании биополимеров, чаще всего предпринимаются измерения поглощения света в видимой и ультрафиолетовой областях. При этом могут ставиться самые разнообразные задачи: от простого определения концентрации до разрешения сложных структурных вопросов. В этом разделе мы сначала рассмотрим ряд основных характеристик метода в целом, а затем некоторые его особенности, возникающие при исследованиях больших молекул.

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ СОСТОЯНИЯ МОЛЕКУЛ

На рис. 7.1 представлено типичное сечение поверхности потенциальной энергии для основного и первого возбужденного электронных состояний простой молекулы. В каждом из этих состояний имеется множество колебательных уровней, которые в свою очередь «расслаиваются» на огромное число вращательных подуровней. Разность энергий нижних колебательно-вращательных подуровней двух разных электронных состояний S_0 и S_1 обычно составляет $80 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$. Эта энергия значительно превышает энергию теплового движения при комнатной температуре. Поэтому в отсутствие излучения, способ-

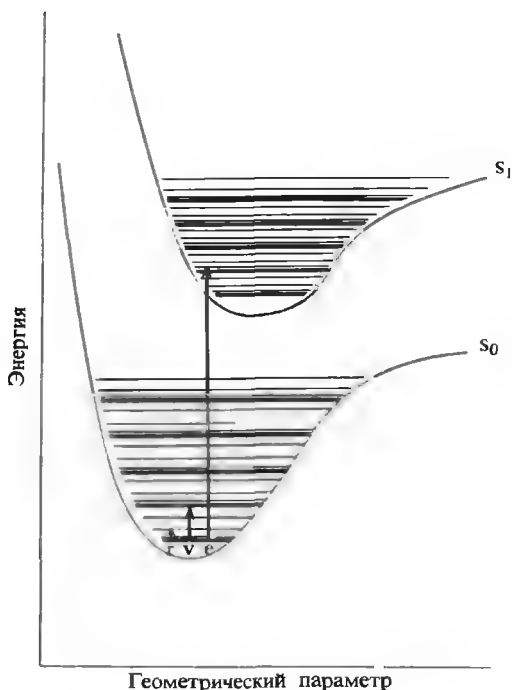


РИС. 7.1. Энергетические уровни для простой молекулы. Показаны некоторые вращательные подуровни (тонкие линии) колебательных уровней (жирные линии) двух электронных состояний. Стрелки указывают переходы между электронными (e), колебательными (v) и вращательными (r) уровнями.

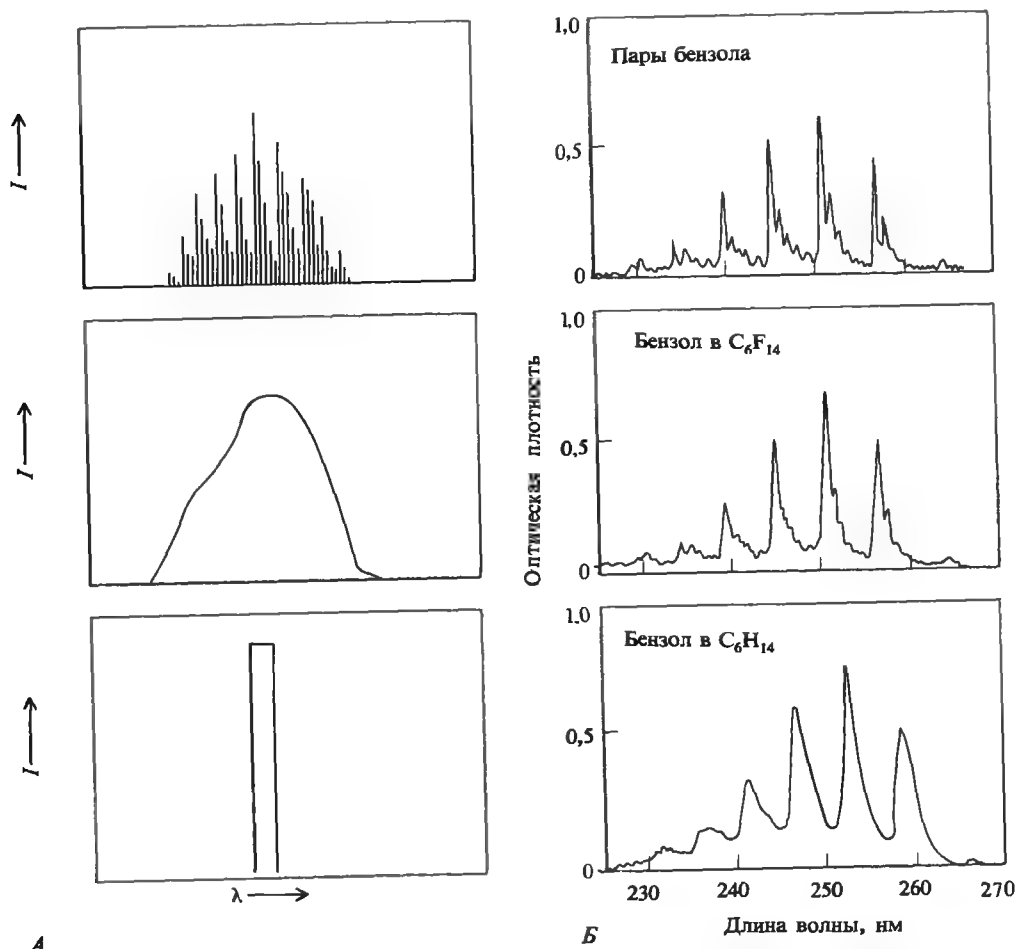


РИС. 7.2. Электронные спектры поглощения простых молекул. А. Спектры, типичные для небольших молекул. Сверху вниз: спектр молекул в газовой фазе, спектр раствора этих же молекул и спектр, обычно используемый при теоретических расчетах. Б. Спектры поглощения бензола, демонстрирующие влияние растворителя на ширину полос. (Birks J.B., *Photophysics of Aromatic Molecules*, New York, Wiley, 1970, p. 117.).

ного перевести молекулу в состояние S_1 , практически все молекулы в растворе будут пребывать в основном электронном состоянии S_0 . Характерная величина разности энергий двух колебательных уровней составляет $10 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$, что также превышает тепловую энергию. Поэтому с хорошей точностью можно считать, что заселен лишь нижний из колебательных уровней состояния S_0 . Однако вращательные уровни отстоят друг от друга на величину порядка $1 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$ и меньше, и, следовательно, многие из них оказываются заселенными.

При поглощении света соответствующей частоты молекула возбуждается и переходит на один из вращательно-колебательных подуровней электронного состояния S_1 . Таким образом, в отсутствие прочих эффектов мы должны получить спектр, состоящий из

огромного числа близко расположенных узких линий. Интенсивность каждой из этих линий будет определяться величиной момента перехода $\langle S_{1, \text{кол.-вр}} | \hat{\mu} | S_0 \rangle$, где $S_{1, \text{кол.-вр}}$ — волновая функция, отвечающая данному колебательно-вращательному уровню состояния S_1 , а S_0 — волновая функция основного состояния. Однако на самом деле эти линии оказываются довольно широкими, в результате чего спектр имеет вид размытых полос, представляющих собой огибающую отдельных линий (рис. 7.2). Уширение линий происходит из-за неоднородности окружения, доплеровского смещения и по ряду других причин. В результате вопреки нашим ожиданиям спектр оказывается весьма невыразительным. Правда, несмотря на потерю значительной доли информации, он обладает неким преимуществом, состоящим в том, что при интерпретации спектров мы можем не рассматривать каждое вращательно-колебательное состояние по отдельности и моделировать спектр при помощи небольшого числа широких электронных полос (7.2, А), как правило подбирая их форму эмпирически. В некоторых специальных случаях (таких, как разреженные газы или особые молекулярные матрицы при очень низких температурах) все же удастся получить узкие спектральные линии даже для больших молекул (Birks, 1970).

КОЭФФИЦИЕНТ ЭКСТИНКТЦИИ

На рис. 7.3, А схематически изображены установки для измерения поглощения света. Падающий свет обладает интенсивностью I_0 при длине волны λ . Его путь в образце (обычно это раствор поглощающих молекул некоторой концентрации C , выражаемой в молях на литр) равен l см. Свет, прошедший через образец, имеет интенсивность I .

Рассмотрим слой образца, перпендикулярный направлению распространения света. Толщину слоя dl выберем достаточно малой, так чтобы интенсивность света в пределах слоя можно было считать постоянной. Тогда доля поглощения света ($-dI/I$) будет пропорциональна числу поглощающих молекул:

$$-dI/I = C\varepsilon' dl \quad (7.32)$$

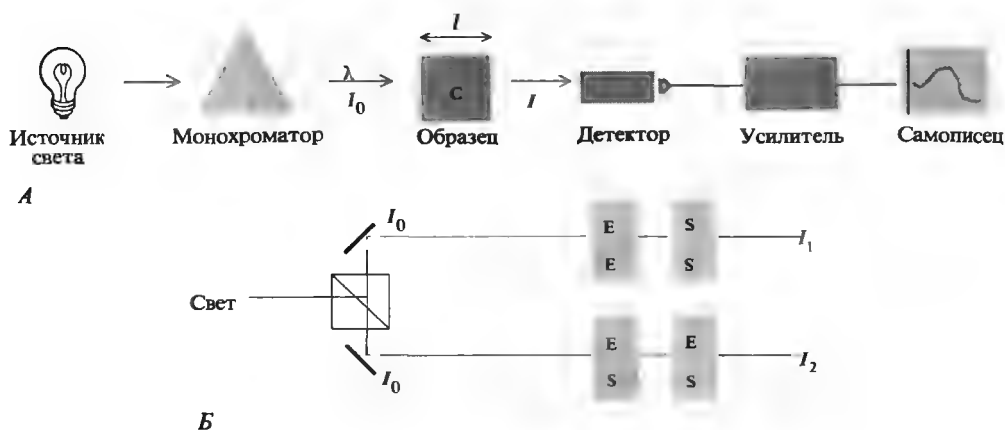


РИС. 7.3. Схематическое изображение установок для измерения поглощения света. А. Измерение поглощения света. Б. Регистрация разностных спектров.

где ε' — коэффициент пропорциональности, именуемый коэффициентом молярной экстинкции. В случае не взаимодействующих молекул величина ε' не зависит от их концентрации, однако, являясь функцией длины волны, меняется с изменением частоты света. Интегрируя уравнение (7.32) (интеграл в левой части берется в пределах от начальной интенсивности I_0 до конечной I , а в правой — от нуля до l), найдем

$$\ln(I_0/I) = C\varepsilon' l \quad (7.33)$$

Переходя к логарифму по основанию 10, получим закон Ламберта — Бэра в его общепринятой форме:

$$A(\lambda) \equiv \lg(I_0/I) = C\varepsilon(\lambda)l \quad (7.34.)$$

где $\varepsilon = \varepsilon' / 2,303$. Величина A называется оптической плотностью образца.

Измерение спектра поглощения обычно имеет своей целью определение величины ε . Максимальные значения $\varepsilon_{\max}$ и длины волны, при которых они наблюдаются ($\lambda_{\max}$), табулируются. Значения $\varepsilon_{\max}$ для разных хромофоров варьируют от $1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ до более чем $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ (см. Дополнение 7.2).

Наиболее точно величину A удастся измерить в том случае, если она лежит в интервале от 0,1 до 2. При $A < 0,1$ образец поглощает лишь ничтожную долю падающего света, если же A превышает 2, это означает, что на детектор падает очень мало света. Для хромофоров с $\varepsilon_{\max} = 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ (таких, как основания нуклеиновых кислот) из уравнения (7.34) получаем, что молярную концентрацию образца толщиной 1 см следует выбирать в пределах от 10^{-5} до 10^{-4} .

В случае макромолекул часто бывает неудобно использовать молярную экстинкцию. Это связано либо с тем, что ее значение очень велико, либо с тем, что мы не знаем молекулярную массу полимера. Поэтому на практике обычно пользуются величиной *экстинкции, приходящейся на один моль мономерных звеньев*. Например, для полинуклеотидов концентрацию выражают как суммарное число молей фосфатов в одном литре. В научной литературе эти две величины нередко путают. К счастью, в большинстве случаев экстинкция в расчете на моль макромолекул отличается от экстинкции, приходящейся на одно звено, по меньшей мере в 10^2 раз, что позволяет избежать ошибки.

Поскольку нас интересует спектр макромолекул, а не растворителя, на практике, как правило, измеряют *разность* поглощений раствора макромолекул и чистого растворителя. Чаще всего для этой цели используют двухлучевой спектрофотометр, автоматически регистрирующий эту разность. Свет, прошедший через образец, имеет интенсивность $I_{\text{обр}}$, которая, согласно уравнению (7.34), определяется из равенства

$$\lg I_{\text{обр}} = \lg I_0 - A_{\text{обр}} \quad (7.35)$$

Аналогично интенсивность света, прошедшего через кювету сравнения, можно найти из равенства

$$\lg I_{\text{ср}} = \lg I_0 - A_{\text{ср}} \quad (7.36)$$

Следовательно, прибор, регистрирующий величину $\lg(I_{\text{ср}}/I_{\text{обр}})$, измеряет разность $A_{\text{обр}} - A_{\text{ср}}$.

Эта же идея лежит в основе метода разностной спектроскопии. Предположим, что нам нужно измерить с высокой точностью небольшие спектральные изменения системы, происходящие, например, при добавлении субстрата к ферменту. Если на пути одного пучка света двухлучевого прибора поместить смесь субстрата и фермента, а на пути другого — два исходных раствора фермента (Е) и субстрата (S), то регистрируемый спектр будет представлять собой разность, обусловленную взаимодействием двух ве-

ществ при образовании фермент-субстратного комплекса. На рис. 7.3., Б изображена схема такого эксперимента с использованием четырех кювет для образцов, каждая из которых имеет длину оптического пути l . При этом измеряется величина

$$\lg(I_2/I_1) = A_1 - A_2 = 2[(\epsilon_E C_E + \epsilon_S C_S) - (\epsilon_E C'_E + \epsilon_S C'_S + \epsilon_{ES} C_{ES})]l$$

где штрихом отмечены концентрации веществ в кюветах, содержащих как E, так и S.

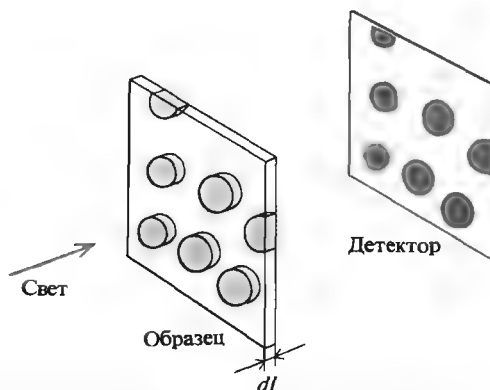
Дополнение 7.2

КОЭФФИЦИЕНТ ЭКСТИНКТЦИИ И СЕЧЕНИЕ ПОГЛОЩЕНИЯ

Получим соотношение между коэффициентом экстинкции и размерами молекул. Рассмотрим слой раствора площади A (в см^2) и толщины dl . Пусть молярная концентрация растворенного вещества равна C ; тогда число молекул этого вещества в 1 см^3 составит $CN_0/1000$, а их число в слое dl будет равно $CAN_0 dl/1000$. Если молекула растворенного вещества имеет радиус r , то часть площади поперечного сечения, занимаемая в слое растворенными молекулами, составит

$$f_{\max} = (\pi r^2 CAN_0 dl/1000)/Adl = \pi r^2 CN_0/1000$$

Если бы каждая молекула поглощала весь падающий на нее свет, эффективность поглощения света была бы максимальной и доля поглощенного света равнялась бы $f_{\max}$, как это изображено на рисунке. Таким образом, приведенное равенство и было бы искомым соотношением между поглощением и размерами молекул.



Если же молекулы не являются абсолютными поглотителями, следует ввести вероятность P того, что падающий на молекулу свет будет поглощен. Тогда доля поглощенного света составит $Pf_{\max}$. Вклад каждой отдельной молекулы будет равен

$$\sigma = P\pi r^2$$

Величину σ называют сечением поглощения молекулы. Таким образом, доля поглощенного света $dl/I = (\sigma CN_0/1000)dl$. Сопоставляя приведенные здесь равенства с уравнениями (7.32) — (7.34), трудно получить, что

$$\epsilon = (\sigma CN_0/1000)/2,303C = \sigma N_0/2,303 = \pi r^2 P N_0/2,303$$

Радиус типичного ароматического кольца лишь ненамного превосходит 1 Å. Поэтому мы можем оценить максимально возможный для веществ этого класса коэффициент экстинкции как величину порядка $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. В действительности даже для сильно поглощающих веществ $\epsilon \approx 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Это означает, что поглощается лишь 10% падающего на хромофор света. (В основе приведенных здесь рассуждений лежат заметки, предоставленные Робертом Дженнисом.)

СВЯЗЬ МЕЖДУ КОЭФФИЦИЕНТОМ ЭКСТИНКЦИИ И НЕКОТОРЫМИ МОЛЕКУЛЯРНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Молярный коэффициент экстинкции определяется эмпирически при помощи уравнения (7.32). Чтобы связать его с молекулярными характеристиками, вернемся к уравнению (7.30). Обычно число возбужденных молекул в образце (N_b) пренебрежимо мало. Следовательно, для одномолярного раствора поглощающих молекул скорость поглощения энергии в 1 см^3 образца равна

$$-dI(\nu)/dt = (h\nu N_0 B_{ab}/1000)I(\nu) \quad (7.37)$$

где ν — частота возбуждающего света, N_0 — число Авогадро. Так как свет распространяется со скоростью c , уменьшение его интенсивности на расстоянии dl равно

$$dI(\nu) = (1/c)[dI(\nu)/dt] dl = (h\nu N_0 B_{ab}/1000c)I(\nu) dl \quad (7.38)$$

Сравнивая уравнение (7.32) и (7.38), можно найти для одномолярного раствора соотношение между величинами B_{ab} и ϵ' . На первый взгляд кажется, что $B_{ab} = 1000 \epsilon' c / N_0 h \nu$. Однако, поскольку наблюдаемые полосы поглощения достаточно широки, а величина B_{ab} определена для двух состояний, разность энергий которых характеризуется вполне определенной частотой (ν), для вычисления B_{ab} необходимо проинтегрировать ϵ' по всему интервалу частот, на который простирается данная полоса (Birks, 1970, p. 48—50):

$$B_{ab} = (1000c/N_0 h) \int (\epsilon'/\nu) d\nu \quad (7.39)$$

Поскольку интегрирование производится по частоте, то спектр, представленный как зависимость ϵ' от длины волны, необходимо преобразовать к виду $\epsilon' = f(\nu)$.

Важный молекулярный параметр, который может быть получен с помощью величины B_{ab} , — это $|\langle \Psi_b | \underline{\mu} | \Psi_a \rangle|^2$. Используя уравнения (7.29) и (7.39) и переходя от ϵ' к ϵ , получим

$$D_{ab} \equiv |\langle \Psi_b | \underline{\mu} | \Psi_a \rangle|^2 = 9,180 \cdot 10^{-3} \int (\epsilon'/\nu) d\nu \text{ (дебай)}^2 \quad (7.40)$$

где все мировые постоянные сведены в один множитель. D_{ab} называется силой диполя; очевидно, эта величина равна площади полосы поглощения при условии, что данная полоса не перекрывается с другими.

Момент перехода $|\underline{\mu}_{ba}|$ обычно выражается в дебаях (10^{-18} СГС-единицы дипольного момента); его типичное значение для интенсивных полос поглощения составляет несколько дебаев. Заметим, что D_{ab} позволяет найти и эту величину: $|\underline{\mu}_{ba}| = |\langle \Psi_b | \underline{\mu} | \Psi_a \rangle|$, но она не содержит информации о поляризации (направлении) перехода.

Другой полезной величиной служит сила осциллятор f_{ab} , равная отношению наблюдаемой интенсивности поглощения к интенсивности, которая имела бы место в случае трехмерного гармонического осциллятора. Можно показать, что

$$f_{ab} = (8\pi^2 mc/3h\nu) D_{ab} = 4,315 \cdot 10^{-9} \int \varepsilon(\nu) d\nu \quad (7.41)$$

где m — масса электрона. f_{ab} — безразмерная величина; ее значение для интенсивных переходов лежит в интервале от 0,1 до 1. Величины D_{ab} и f_{ab} очень важны для понимания целого ряда оптических эффектов, наблюдаемых в полимерах.

ЛИНЕЙНЫЙ ДИХРОИЗМ ОРИЕНТИРОВАННЫХ ОБРАЗЦОВ

В растворе молекулы ориентированы хаотически, поэтому с помощью даже поляризованного света можно измерить лишь пространственно усредненную величину электрического момента перехода:

$$|\langle \Psi_b | \underline{\mu} | \Psi_a \rangle \cdot \mathbf{E}_0|^2 = (1/3)(\mu_x^2 + \mu_y^2 + \mu_z^2) E_0^2$$

Для получения информации о внутримолекулярной ориентации μ_{ba} необходимо использовать ориентированные образцы, где поглощение зависит от $\underline{\mu} \cdot \mathbf{E}_0$. Такие образцы можно приготовить несколькими способами. Как макромолекулы, так и небольшие молекулы можно изучать в кристаллах или волокнах. Длинные асимметричные молекулы удается ориентировать в потоке или при помощи электрического поля (гл.12). Молекулы могут быть ориентированы также при нанесении на подложку вязкого раствора с помощью кисточки. Все эти способы, за исключением кристаллизации, не дают полной ориентации молекул.

Рассмотрим систему молекул эллипсоидной формы (рис. 7.4.); такой образец может быть получен, например, при ориентировании в потоке. Молекулы ориентированы преимущественно вдоль оси z , что позволяет измерить z -компоненту величины μ_{ab} (μ_z). Однако молекулярные оси x и y ориентированы хаотически, и, следовательно μ_x и μ_y по-прежнему не могут быть определены по отдельности. На опыте обычно измеряют два коэффициента экстинкции, $\varepsilon_{\parallel}$ и $\varepsilon_{\perp}$, отвечающие поглощению света, поляризованного параллельно и перпендикулярно оси z . На основании полученных таким образом спектров можно при помощи уравнения (7.40) найти $D_{\parallel} = \mu_z^2$ и $D_{\perp} = (1/2)(\mu_x^2 + \mu_y^2)$.

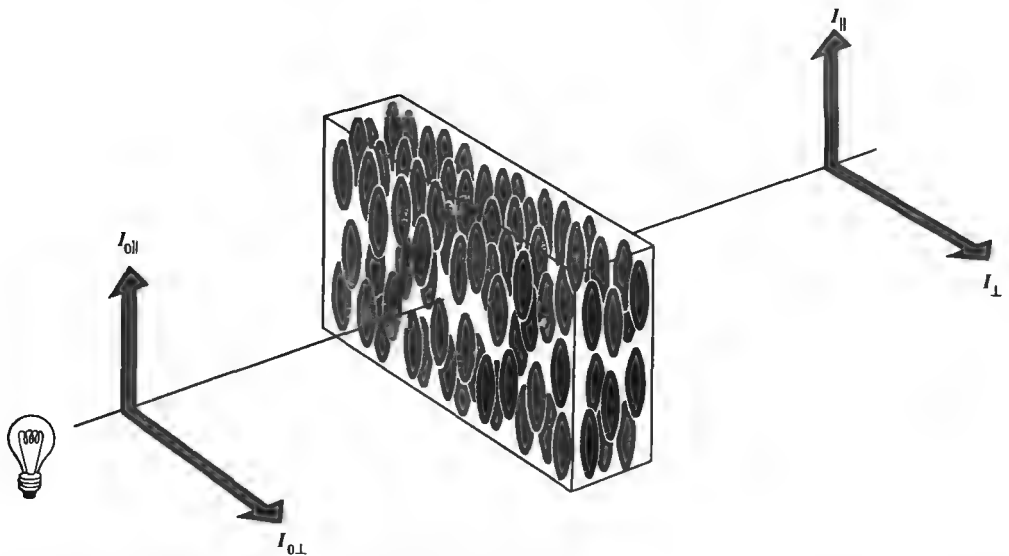


РИС. 7.4. Схема эксперимента по измерению линейного дихроизма. Все молекулы образца ориентированы своими длинными осями вдоль направления $I_{\parallel}$.

Концентрацию ориентированных молекул не всегда удастся установить точно. В этих случаях измеряют не коэффициент экстинкции, а оптическую плотность. Поэтому экспериментальные результаты часто бывает удобнее выразить в виде отношения

$$d = (A_{\parallel} - A_{\perp}) / (A_{\parallel} + A_{\perp}) \quad (7.42)$$

которое служит мерой дихроизма образца. Здесь $A_{\parallel}$ — оптическая плотность образца для света, поляризованного параллельно оси z , а $A_{\perp}$ — перпендикулярно ей.

Измерение дихроизма используется в трех видах исследований. Наиболее простым из них является установление того, порождается ли данная полоса поглощения одним электронным переходом. Иными словами — только ли два электронных состояния определяют данную часть спектра. Если это так, то отношение, характеризующее дихроизм, должно оставаться постоянным на протяжении всей полосы. Предположим, напротив, что переходам $a \rightarrow b$ и $a \rightarrow c$ соответствуют сильно перекрывающиеся полосы. Тогда с большой вероятностью можно ожидать, что моменты переходов μ_{ba} и μ_{ca} окажутся непараллельными. В этом случае величина d не будет оставаться постоянной при изменении длины волны и может даже изменить знак (см. рис. 7.5.).

Когда известно направление момента перехода какого-либо хромофора, из данных по дихроизму можно получить информацию о структуре макромолекулы. Например, моменты наиболее интенсивных переходов для плоских ароматических молекул лежат в плоскости сопряженных колец, и можно установить ориентацию таких колец относительно молекулы в целом. Точность определения зависит от достоверности данных об ориентации момента перехода и от степени ориентированности молекул образца.

Если структура образца точно известна (как, например, в случае тонкого скола кристалла), то измерение дихроизма позволяет определить направление момента перехода. Правда, при интерпретации подобных данных следует проявлять определенную осторож-

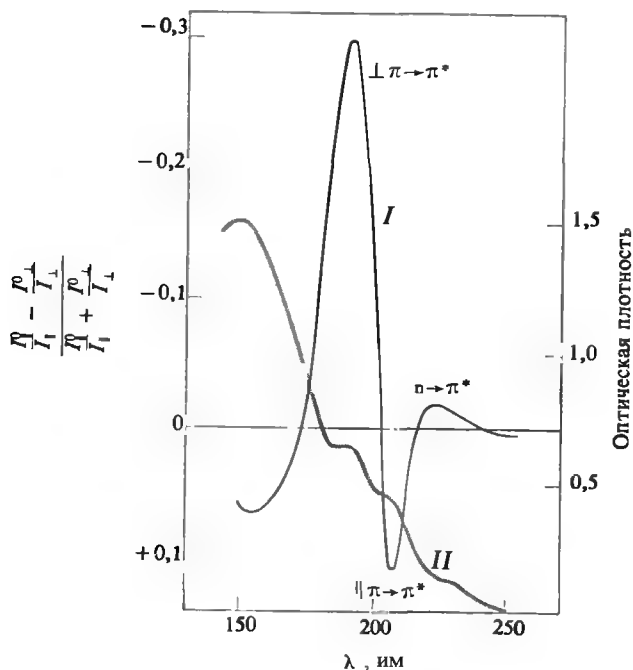


РИС. 7.5. Линейный дихроизм (I) и поглощение (II) пленки поли-L-глутаминовой кислоты. Полипептид имеет α -спиральную структуру. Указаны полосы, соответствующие $\pi \rightarrow \pi^*$, а также $\pi \rightarrow \pi_{\parallel}^*$ и $\pi \rightarrow \pi_{\perp}^*$ -переходам. Заметим, что спектр линейного дихроизма представлен в других единицах, чем спектр поглощения. [J. Brahms, J. Pilet, H. Damang, V. Chandrasekharan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **60**, 1130 (1968).].

ность, так как возникающие из-за близкого расположения в кристалле межмолекулярные взаимодействия могут заметно изменить ориентацию моментов перехода. При необходимости эту трудность можно обойти, исследуя интересующее нас вещество после совместной кристаллизации небольшого его количества с другим веществом, близким по молекулярной структуре к изучаемому, но не поглощающим свет в данной части спектра.

СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ПРОСТЫХ МОЛЕКУЛ: ФОРМАЛЬДЕГИД

Прежде чем рассматривать поглощение света группами, входящими в состав белков и нуклеиновых кислот, стоит остановиться на свойствах более простых молекул. Выводы, которые мы при этом получим, будут носить достаточно общий характер.

Как выглядят электронные состояния простой молекулы? В общем случае для ответа на этот вопрос необходимо решить стационарное уравнение Шредингера (7.12) для системы многих частиц. Для системы, содержащей хотя бы несколько тяжелых атомов, получить сколько-нибудь точное решение такого уравнения невозможно. Однако при помощи разнообразных приближенных методов удалось сделать ряд полезных заключений общего характера. Например, большинство электронов фактически находится вблизи какого-либо одного ядра, и их орбитали несильно отличаются от орбиталей в случае изолированного атома. Другие электроны оказываются делокализованными по орбиталям, окружающим сразу несколько ядер. Эти электроны, как правило, участвуют в низкоэнергетических переходах.

Чтобы проиллюстрировать результаты приближенных квантовомеханических расчетов, рассмотрим молекулу формальдегида (рис. 7.6). Сначала мы опишем структуру связей в основном состоянии, а затем охарактеризуем некоторые из низколежащих возбужденных состояний. Затем мы оценим направления и величины электрических моментов переходов между основным и возбужденным состояниями. На основании этих результатов мы сумеем предсказать относительные интенсивности некоторых полос поглощения формальдегида, а также ожидаемый линейный дихроизм.

Четыре атома, входящие в состав молекулы формальдегида, содержат в общей сложности 16 электронов. Рассмотрим вначале эти атомы по отдельности. Каждый атом водорода обладает одним электроном, находящимся на атомной орбитали $1s$. Эта орбиталь обладает сферической симметрией относительно ядра. Шесть электронов углерода и восемь электронов кислорода занимают орбитали $1s^2 2s^2 2p_y 2p_x$ и $1s^2 2s^2 2p_y^2 2p_x 2p_z$ соответственно. $2p$ -Орбитали обладают цилиндрической симметрией относительно ядра; индексы x , y и z указывают оси симметрии. Размещение двух электронов атома кислорода на орбитали $2p_y$ и по одному на остальных $2p$ -орбиталях является произвольным. Отметим, что каждая из $2p$ -орбиталей имеет узел (область пространства, где электронная плотность равна нулю).

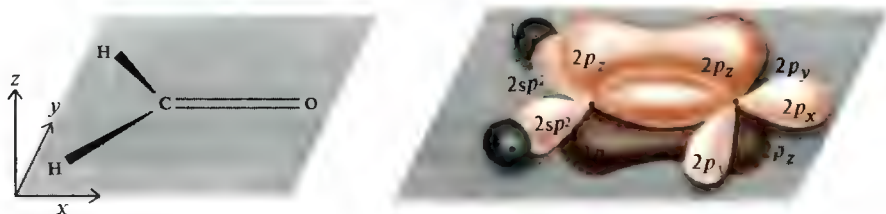
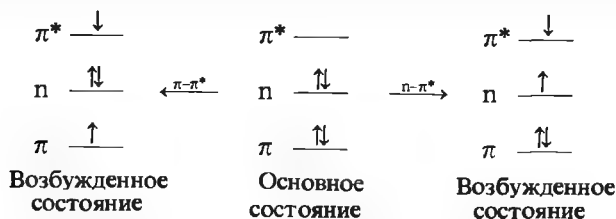


РИС. 7.6. Схематическое изображение молекулы формальдегида и соответствующих молекулярных орбиталей.

Рассмотрим те изменения, которые претерпевают атомные орбитали при образовании молекулы формальдегида. Чтобы объяснить, почему угол между связями в формальдегиде равен 120° , необходимо принять несколько иное описание электронной конфигурации атома углерода: $1s^2(2sp^2)^32p_z$. Здесь одна $2s$ - и две $2p$ -орбитали образуют три гибридные $2sp^2$ -орбитали, направленные к вершинам равностороннего треугольника. Электроны на $1s^2$ -орбиталях углерода и на $1s^2$ - и $2s^2$ -орбиталях кислорода настолько сильно локализованы около своих ядер, что практически не вносят вклада в образование химической связи. Две C—H-связи образуются благодаря перекрыванию гибридных sp^2 -орбиталей углерода и $1s$ -орбиталей водорода. Третья sp^2 -орбиталь вместе с $2p_x$ -орбиталью кислорода участвует в образовании простой связи. Эта связь называется σ -связью; она не имеет узлов электронной плотности. Вне нашего рассмотрения остались только $2p_z$ -орбиталь атома углерода и $2p_z$ - и $2p_y$ -орбитали атома кислорода. Перекрывание однократно заселенных $2p_z$ -орбиталей углерода и кислорода может приводить к образованию молекулярной π -орбитали. На ней располагаются два электрона, образуя так называемую π -связь (она имеет одну узловую плоскость). Оставшиеся два электрона атома кислорода находятся на атомной орбитали $2p_y$. Таким образом, в основном состоянии H_2CO атомы кислорода и углерода оказываются соединенными двойной связью. Наиболее высокоэнергетическими заполненными орбиталями являются π -связывающая орбиталь и несвязывающая (n) $2p_y$ -орбиталь кислорода.

При описании основного состояния H_2CO мы представили молекулярные орбитали в виде линейных комбинаций $2p_x$ -орбиталей атомов углерода и кислорода. Тогда соответствующие волновые функции должны выглядеть как $\Psi_\pi = 2p_z(\text{углерод}) + 2p_z(\text{кислород})$; возможна еще одна линейная комбинация: $\Psi_{\pi^*} = 2p_z(\text{углерод}) - 2p_z(\text{кислород})$. Эта последняя π^* -орбиталь будет обладать большей энергией, чем π -орбиталь, и иметь дополнительную узловую плоскость. Схема энергетических уровней имеет следующий вид:



Два электронных перехода с наименьшей энергией должны наблюдаться при возбуждении электрона с n -орбитали на π^* -орбиталь ($n \rightarrow \pi^*$ -переход) и с π -орбитали на π^* -орбиталь ($\pi \rightarrow \pi^*$ -переход).

Чтобы оценить интенсивность поглощения, отвечающего этим переходам, нужно определить соответствующие моменты переходов $\langle i | \mu | f \rangle$, где i — начальное, а f — конечное состояния. Поскольку переходы затрагивают только один из электронов молекулы, при определении $\langle i | \mu | f \rangle$ нужно рассмотреть лишь две орбитали, непосредственно участвующие в переходе. Обозначим волновые функции n -, π - и π^* -орбиталей соответствующими буквами. Тогда интегралы, которые нам нужно оценить, запишутся просто как $\langle n | \mu | \pi^* \rangle$ и $\langle \pi | \mu | \pi^* \rangle$. Проще всего получить такую оценку из соображений симметрии.

Искомые матричные элементы представляют собой интегралы по всему пространству и не должны зависеть от выбора системы координат. Если подынтегральное выражение является нечетной функцией (меняет знак) при отражении относительно любой из плоскостей, задаваемых осями декартовой системы координат, то интеграл равен нулю. На рис. 7.7 показана форма верхних заполненных и нижних незаполненных орбиталей формальдегида. Сначала мы применим соображения симметрии при анализе свойств волновых функций. Рассмотрим интеграл $\langle \pi | \mu | \pi^* \rangle$. Как видно из рис. 7.7, π является четной функ-

Молекулярные орбитали	Вид вдоль		Симметрия при отражении относительно плоскостей		
	оси x	оси y	xy	xz	yz
π			Нечетная	Четная	Четная
π^*			Нечетная	Четная	Нечетная
n			Четная	Нечетная	Не обладает симметрией
Составляющие оператора дипольного момента					
μ_x			Четная	Четная	Нечетная
μ_y			Четная	Нечетная	Четная
μ_z			Нечетная	Четная	Четная

РИС. 7.7. Симметрия молекулярных орбиталей формальдегида и составляющих оператора дипольного момента.

цией при отражении относительно плоскости yz [$\pi(x) = \pi(-x)$], а π^* — нечетной [$\pi^*(x) = -\pi^*(-x)$]. Следовательно, их произведение также является нечетной функцией. Любой вклад в интеграл от $\pi\pi^*(x)$ будет в точности компенсироваться вкладом от $\pi\pi^*(-x)$, равного $-\pi\pi^*(x)$. Таким образом, $\langle \pi | \pi^* \rangle = 0$, т.е. функции π и π^* взаимно ортогональны. Рассуждая таким же образом, можно показать, что $\langle \pi | n \rangle = \langle \pi^* | n \rangle = 0$.

Для оценки величины $\langle i | \mu | f \rangle$ оказывается удобным представить μ в виде суммы векторов: $\mu = \hat{i}\mu_x + \hat{j}\mu_y + \hat{k}\mu_z$ и рассмотреть каждую из трех декартовых компонент (μ_x , μ_y и μ_z) отдельно. Свойства их симметрии указаны на рис. 7.7. Оценим компоненты момента $\pi \rightarrow \pi^*$ -перехода.

1. $\langle \pi | \mu_x | \pi^* \rangle$ не равен нулю — произведение π , π^* и μ_x является четным при отражении относительно любой из плоскостей xy , yz или xz ;
2. $\langle \pi | \mu_y | \pi^* \rangle$ равен нулю, так как подынтегральное выражение является нечетным при отражении как относительно плоскости xz , так и плоскости yz ;
3. $\langle \pi | \mu_z | \pi^* \rangle$ также равен нулю, поскольку это произведение оказывается нечетным при отражении относительно плоскостей xy и yz .

В результате мы получаем, что $\langle \pi | \mu | \pi^* \rangle = i \langle \pi | \mu_x | \pi^* \rangle$. Переход $\pi \rightarrow \pi^*$ называется разрешенным, так как его момент не равен нулю. Однако сильное поглощение может иметь место, только если вектор электрического поля параллелен молекулярной оси x . При этом говорят, что переход поляризован вдоль $C=O$ -связи.

Для $n \rightarrow \pi^*$ -перехода мы должны проанализировать компоненты интеграла $\langle n | \mu | \pi^* \rangle$:

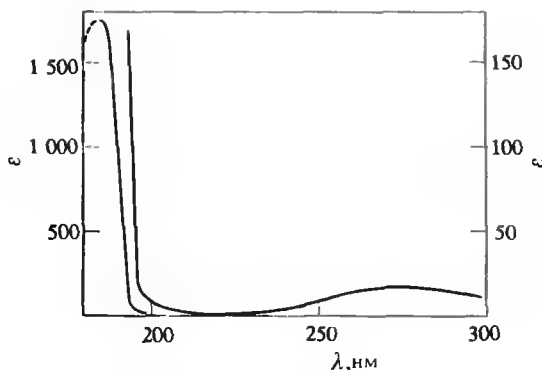


РИС. 7.8. Спектр поглощения ацетона ($\text{CH}_3-\text{CO}-\text{CH}_3$) в н-гексане. Проявляются $n \rightarrow \pi^*$ -переход (280 нм) и $\pi \rightarrow \pi^*$ -переход (180 нм). Заметим, что для изображения $n \rightarrow \pi^*$ -перехода потребовалось более растянутая шкала. Спектр формальдегида ($\text{H}-\text{CO}-\text{H}$) должен быть весьма сходным со спектром ацетона. К сожалению, получить спектр формальдегида в растворе трудно. Использование гидроксильных растворителей приводит к образованию гидратов или полуацеталей, а применение менее полярных растворителей ведет к тримеризации формальдегида с образованием шестичленного кольца, в котором чередуются O и CH_2 . (B. Wells, неопубликованные данные.)

1. $\langle n | \mu_x | \pi^* \rangle$ равен нулю, поскольку он является нечетным при отражении относительно плоскостей xu и xz ;
2. $\langle n | \mu_y | \pi^* \rangle$ равен нулю из-за нечетности при отражении относительно плоскости xu ;
3. $\langle n | \mu_z | \pi^* \rangle$ равен нулю из-за нечетности при отражении относительно плоскости xz .

Следовательно, $\langle n | \mu | \pi^* \rangle = 0$ и про $n \rightarrow \pi^*$ -переход говорят, что он запрещен по симметрии. Однако это не означает, что он не происходит совсем. Приведенное рассмотрение является упрощенным и не учитывает колебаний молекулы, а также использует приближенные волновые функции. На самом деле $n \rightarrow \pi^*$ -переход дает полосу поглощения, но ее интенсивность очень мала и составляет примерно 1 % интенсивности типичной $\pi \rightarrow \pi^*$ -полосы. Пример такого рода приведен на рис. 7.8.

7.3. Спектроскопия биополимеров

СПЕКТРАЛЬНАЯ ОБЛАСТЬ, В КОТОРОЙ ПРОВОДЯТСЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОПОЛИМЕРОВ

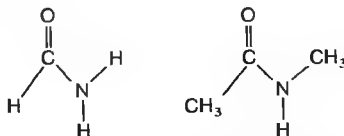
Любая молекула поглощает свет в достаточно широкой области длин волн. Однако при данной длине волны в спектре обычно преобладает поглощение химических групп лишь одного типа. Эти группы называются хромофорами. Хромофоры, входящие в состав белков и нуклеиновых кислот, поглощают свет только при длинах волн, меньших чем 300 нм. Эти группировки, такие, как пептидные группы или основания нуклеиновых кислот, значительно сложнее молекулы формальдегида. Подробное обсуждение их электронной структуры выходит за рамки этой книги, и мы лишь перечислим те их свойства, которые облегчают или, напротив, усложняют спектральные исследования белков и нуклеиновых кислот.

Одно из главных ограничений спектроскопии биополимеров состоит в необходимости работать с растворами. Очевидно, что изучение таких больших молекул в газовой фазе не-

возможно. Спектральные исследования в твердой фазе осложняются дихроичными эффектами, а также трудностями, связанными с соотношением молекулярных свойств, полученных при исследовании в твердом состоянии, со свойствами этих же молекул в растворе, где обычно проводятся биологические исследования. Для подавляющего большинства белков и нуклеиновых кислот наиболее пригодными для имитации условий *in vivo* растворителями являются водные буферные растворы при $\text{pH} \cong 7,0$, содержащие достаточные количества электролитов (например, $\sim 0,15 \text{ M NaCl}$). Использование воды в качестве растворителя автоматически ограничивает спектральные измерения областью длин волн, больших чем 170 нм. Ниже этого предельного значения поглощение даже очень тонких ($\sim 1 \text{ мкм}$) водных пленок столь велико, что регистрация на его фоне какого бы то ни было вклада от макромолекул требует высокой точности¹⁾. Из-за того что вода обладает высокой полярностью, электронные полосы поглощения в водных растворах оказываются заметно шире, чем для большинства других растворителей. Энергия отдельных молекул различается, поскольку сильное взаимодействие их с молекулами растворителя меняется в зависимости от конфигурации окружения. Это приводит к тому, что колебательная структура электронных полос практически не проявляется. Другая трудность связана с узостью температурного интервала, в котором вода существует в жидком состоянии. Для белков и нуклеиновых кислот это не столь важно, однако в случае многих модельных соединений невозможность проводить измерения ниже 0°C и выше 100°C оказывается подчас весьма огорчающим обстоятельством.

ПОГЛОЩЕНИЕ БЕЛКОВ В ДАЛЬНОЙ УФ-ОБЛАСТИ ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ ПЕПТИДНЫМИ ГРУППАМИ

Хромофоры белковых молекул удобно разделить на три класса: собственно пептидные группы, боковые группы аминокислотных остатков и простетические группы. Для изучения свойств пептидных хромофоров можно использовать модельные соединения, такие, как формамид или N-метилацетамид:



Некоторые аспекты электронной структуры пептидной группы обсуждались в гл. 5. π -Электроны этой группы в известной мере делокализованы по трем атомам: азоту, углероду и кислороду. Среди наблюдаемых в пептидной группе переходов наименьшей энергией обладает $\pi \rightarrow \pi^*$ -переход. Как и в случае формальдегида, π -электрон локализован на атоме кислорода, и этот переход запрещен по симметрии.

$n \rightarrow \pi^*$ -Полоса поглощения в пептидах обычно наблюдается при 210–220 нм и является очень слабой ($\epsilon_{\text{max}} \approx 100$). В качестве примера на рис. 7.9. приведены спектры поглощения разных структурных форм поли-L-лизина. В случае α -спиральной конформации полимера $n \rightarrow \pi^*$ -переход проявляется в виде небольшого плеча с $\lambda \approx 220 \text{ нм}$ на фоне гораздо более сильной полосы с максимумом вблизи 190 нм. Эта интенсивная полоса, главная в доступной для измерений области, порождается $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходом ($\epsilon_{\text{max}} \approx 7000$). В молекуле формальдегида этот самый низкоэнергетический $\pi \rightarrow \pi^*$ -переход поляризован вдоль $\text{C}=\text{O}$ -связи. Поскольку электроны атома азота, находящегося в составе пептидной

¹⁾ Для измерения при $\lambda < 200 \text{ нм}$ необходимо позаботиться о выборе прозрачных в этой области солей и буферов. Наиболее пригодными для этих целей являются соли хлорной и плавиковой кислот (перхлораты и фториды).

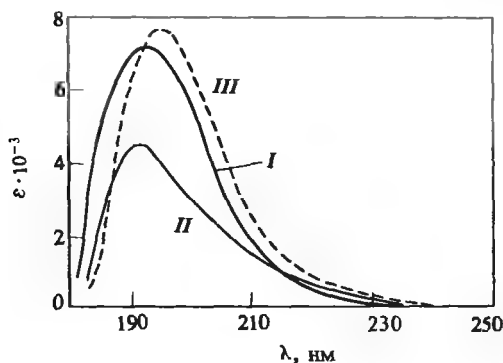
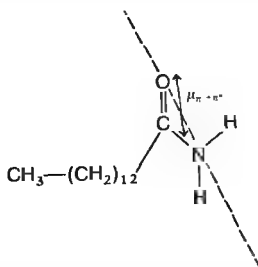


РИС. 7.9. Спектр поглощения поли-L-лизина в водном растворе. *I* — беспорядочный клубок, pH 6,0, 25°C. *II* — α -спираль, pH 10,8, 25°C. *III* — β -слой, pH 10,8, 52°C. [K. Rosenheck, P. Doty, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **47**, 1775 (1961).]

группы, принимают участие в образовании π - и π^* -орбиталей, момент $\pi \rightarrow \pi^*$ -перехода уже не направлен вдоль какой-либо определенной связи. В миристиамиде он лежит в плоскости пептидной группы вблизи линии, соединяющей атомы кислорода и азота:

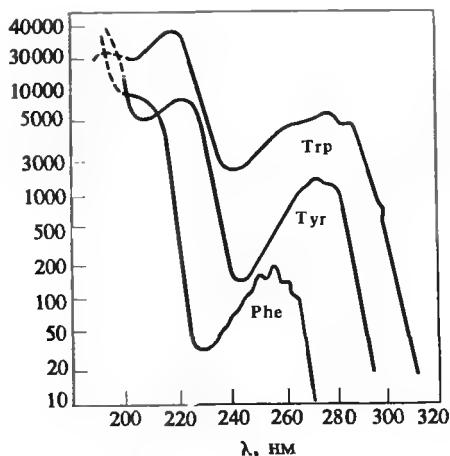


При еще более высоких энергиях можно наблюдать третий переход с $\lambda_{\max}$ около 175 нм. Предположительно считают, что это $\pi \rightarrow \sigma^*$ -переход.

ПОГЛОЩЕНИЕ БЕЛКОВ В БЛИЖНЕЙ УФ-ОБЛАСТИ ОБУСЛОВЛЕНО АРОМАТИЧЕСКИМИ АМИНОКИСЛОТАМИ

Для боковых групп некоторых аминокислот, таких, как Asp, Glu, Asn, Gln, Arg и His, наблюдаются электронные переходы с энергией, лежащей в той же области, что и энергия переходов, обуславливающих сильное поглощение пептидной группы. Зарегистрировать эти переходы в белках или полипептидах почти невозможно, поскольку они уступают по интенсивности $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходу пептидной группы и к тому же число соответствующих боковых групп обычно меньше, чем число пептидных групп. Таким образом, наиболее информативными оптическими свойствами боковых групп являются те, которые проявляются при длинах волн, превышающих 230 нм, где вклад в поглощение пептидных групп становится пренебрежимо малым. В интервале от 230 до 300 нм, в ближней УФ-области, лежат полосы поглощения ароматических аминокислот, Phe, Tyr и Trp, а также двух других боковых цепей — гистидиновой и дисульфидного мостика (цистина). Спектры поглощения этих трех ароматических аминокислот при нейтральных pH представлены на рис. 7.10. Использование логарифмической шкалы обусловлено большими различиями в экстинкции. Поглощение триптофана значительно сильнее, чем двух других аминокислот. Однако он редко присутствует в белках в больших количествах, поэтому вклад тирозина в поглощение белка также оказывается весьма значительным. $\epsilon_{\max}$ фенилаланина гораздо

РИС. 7.10. Спектры поглощения трех ароматических аминокислот. Чтобы изобразить все три кривые на одном рисунке, использована логарифмическая шкала. [D.B. Wetlaufer, Adv. Protein Chem., 17, 303 (1962).]



меньше — всего около $200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ при 250 нм. По этой причине обнаружить его присутствие в белках, содержащих другие ароматические аминокислоты, оптическими методами почти невозможно. Поглощение фенилаланина при 250 нм обусловлено запрещенным по симметрии $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходом; ту же природу имеет полоса при 256 нм в бензоле ($\epsilon_{\text{max}} \approx 400$). В тирозине локальная симметрия оказывается значительно ниже, а наблюдаемый при 274 нм переход — значительно интенсивнее ($\epsilon_{\text{max}} \approx 1400$); аналогичный переход наблюдается в молекуле фенола при 271 нм ($\epsilon_{\text{max}} \approx 2000$). Спектр индольной боковой группы триптофана имеет сложную природу; в достаточно узком интервале длин волн — от 240 до 290 нм — располагаются три или более электронных перехода (подробнее см. Weinryb, Steiner, 1971).

Изменение pH мало влияет на спектры поглощения изолированных пептидных хромофоров. В противоположность этому тирозин и триптофан весьма чувствительны к pH, так как места протонирования этих молекул непосредственно связаны с системой электронного сопряжения хромофоров. Наиболее ярко это проявляется в спектральном сдвиге у тирозина, когда отщепляется протон OH-группы ($pK_a \approx 10,9$) (см. рис. 7.11). Этот сдвиг можно весьма точно зарегистрировать, просто измеряя поглощение при 295 нм. Снимая разностные спектры при этой длине волны, можно с высокой точностью следить за титрованием остатков тирозина в белках. Влияние pH на поглощение триптофана не столь существенно, чтобы использовать его для аналогичных измерений. К тому же значения pK_a триптофана лежат вне области значений pH, при которых большинство белков сохраняет свою нативность.

Измерение поглощения цистеинов в белках затруднено тем, что наиболее длинноволновый интенсивный переход ($\lambda_{\text{max}} \approx 230 \text{ нм}$) приходится на область поглощения пептидной группы. Полосы поглощения дисульфидных мостиков (цистинов) лежат в более длинноволновой области, с λ_{max} около 250 и 270 нм, но их интенсивность слишком мала ($\epsilon \approx 300$), чтобы заметно сказываться на поглощении белка. Тем не менее вклад этих переходов в оптическую активность белков весьма ощутим.

Поскольку некоторые из упомянутых боковых групп поглощают в той же области, что и пептидные группы, их присутствие иногда затрудняет спектральные исследования белков. Когда белок содержит лишь несколько сильно поглощающих остатков, становятся возможными однозначная идентификация и анализ различных компонентов спектра. Наличие большого количества ароматических остатков затрудняет подразделение спектра

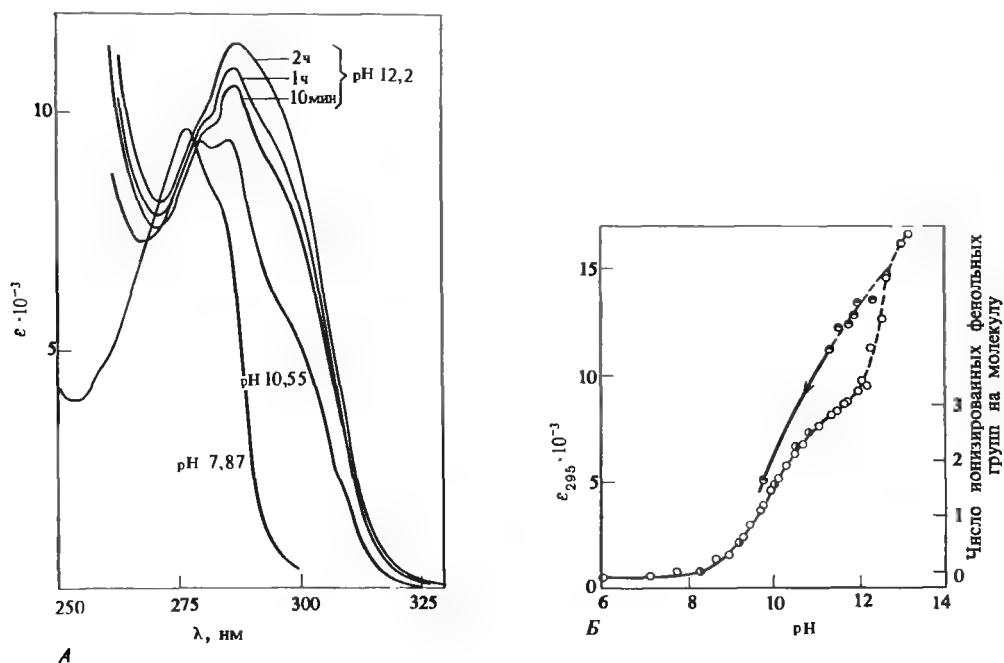


РИС. 7.11. Спектрофотометрическое титрование панкреатической РНКазы быка. А. Изменение спектра поглощения с изменением рН и со временем (при рН 12,2). При меньших значениях рН зависимость от времени отсутствует. Б. Зависимость коэффициента экстинкции при 295 нм от рН. Участки, изображенные сплошной линией, отвечают данным, не зависящим от времени. РНКаза содержит шесть тирозиновых остатков. Представленные результаты показывают, что три из них титруются обратимо, причем их pK_a равно 10,2, т.е. обычному значению. Три других не титруются и при более высоких рН, вплоть до денатурации белка, что приводит к гистерезису, наблюдаемому при обратном титровании. ○ — прямое титрование; ● — обратное титрование после достижения рН 11,5; ◐ — обратное титрование после достижения рН 12,7. [C.Tanford, J.D.Hauenstein, D.G.Rands, J.Am. Chem. Soc., 77, 6409 (1955).]

вблизи 200 нм на отдельные составляющие, которые отвечали бы боковым группам и пептидному остову.

ВЛИЯНИЕ ПРОСТЕТИЧЕСКИХ ГРУПП

Наличие в том или ином белке простетической группы создает те же проблемы, что и присутствие ароматических аминокислот. Например, гемы, флавины, пиридоксальфосфат и некоторые металлопротеиды обладают интенсивными полосами поглощения в ближней УФ- и видимой областях. По этим полосам, обычно весьма чувствительным к ближайшему окружению простетических групп, можно с успехом следить за их состоянием, например за окислением или окисгенацией. При исследовании многих ферментативных процессов физическими методами наличие таких удобно расположенных хромофоров подчас оказывается просто необходимым.

Однако присутствие в белках простетических групп создает и определенные трудности. Почти все хромофоры, которые поглощают в ближней УФ- или видимой областях, име-

ют столь же интенсивные переходы в интервале от 200 до 300 нм. Если такие хромофоры содержатся в белке в большом количестве, они могут сильно мешать исследованию собственно полипептида. Обойти эту трудность можно, используя апобелки, лишенные простетической группы. Однако при этом исследователь обязан убедиться, что подобная процедура не искажает сколько-нибудь заметно структуру полипептидной цепи. Для этого редко бывает достаточно прямых оптических измерений. Если сумма спектров изолированной простетической группы и апобелка совпадает со спектром нативного холобелка, это несколько обнадеживает. Однако, как правило, подобной аддитивности не наблюдается. Даже в отсутствие конформационных изменений спектры как простетической группы, так и белка изменяются под действием электронных взаимодействий.

Наличие простетической группы оказывается полезным лишь при условии, что она обладает достаточно большим коэффициентом молярной экстинкции, дабы быть заметной при типичных концентрациях белка. Последние во избежание агрегации должны быть меньше $2,5 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$. Если простетические группы обладают $\epsilon_{\text{max}} = 10^3 - 10^4$, то тем самым обеспечивается более чем достаточная экспериментальная чувствительность в широком диапазоне концентраций. В табл. 7.2 кратко суммированы спектральные свойства некоторых белков, содержащих наиболее распространенные простетические группы.

Таблица 7.2

СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ,
СОДЕРЖАЩИХ ПРОСТЕТИЧЕСКИЕ ГРУППЫ

Белок	Простетическая группа	Первая и вторая наиболее длинноволновые полосы поглощения			
		λ_{max} , нм	$\epsilon_{\text{max}} \times$ $\times 10^{-4}$	λ_{max} , нм	$\epsilon_{\text{max}} \times$ $\times 10^{-4}$
Оксидаза аминокислот из почек крысы	Флавиномононуклеотид	455	1,27	358	1,07
Азурин из <i>P. fluorescens</i>	Cu (II)	781	0,32	625	0,35
Церулоплазмин человека	8Cu (3 различных типа)	794	2,2	610	1,13
Восстановленный цитохром c человека	Fe (II)-гем	550	2,77	—	—
Ферредоксин из <i>Scenedesmus</i>	[2Fe (III)-2S]-кластер	421	0,98	330	1,33
Флаводоксин из <i>C. pasteurianum</i>	Флавиномононуклеотид	443	0,91	372	0,79
Моноаминоксидаза из почек быка	Флавины + Cu	445	4,7	—	—
Пируватдегидрогеназа из <i>E.coli</i>	Флавинадениндинуклеотид	460	1,27	438	1,46
Родопсин быка	Ретиналь-Lys	498	4,2	350	1,1
Рубредоксин из <i>M.aerogenes</i>	[Fe (III)-4Cys]-тетраздр	570	0,35	490	0,76
Треониндезаминаза из <i>E.coli</i>	4 пиридоксальфосфата	415	2,6	—	—
Ксантиноксидаза	Fe, Mo .	550	2,2	—	—

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА ИЗ ДАННЫХ ПО УФ-ПОГЛОЩЕНИЮ

Типичный белок, не содержащий простетических групп, имеет максимум поглощения в ближней УФ-области при $\lambda_{\max} = 280$ нм. Коэффициенты экстинкции триптофана и тирозина при этой длине волны составляют приблизительно 5700 и $1300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ соответственно. В первом приближении можно считать, что экстинкция этих аминокислот не претерпевает значительных изменений при их включении в белковую цепь. Поскольку никакие другие остатки не дают заметного вклада в поглощение при 280 нм, коэффициент экстинкции белка можно определить, зная число остатков тирозина ($n_{\text{Тир}}$) и триптофана ($n_{\text{Трп}}$). Оптическая плотность раствора с концентрацией $1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ и толщиной 1 см равна $(5700 n_{\text{Трп}} + 1300 n_{\text{Тир}})/M$, где M — молекулярная масса. Вычисленная таким способом оптическая плотность 14 выбранных наугад белков составила $1,1 \pm 0,5$. Таким образом, предполагая, что раствор любого белка с концентрацией $1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ обладает оптической плотностью $1,0$, можно, рискуя вдвое ошибиться, определить весовую концентрацию белка, измеряя его поглощение при 280 нм. Этот метод не приводит к разрушению образца, однако по своей чувствительности почти на порядок уступает колориметрическому тесту Лоури. Чувствительность прямых измерений поглощения можно увеличить, перейдя к длине волны 230 нм. Все остатки обладают в этой области молярной экстинкцией, примерно равной 300 (среднее от вклада, даваемого перекрывающимися полосами для боковых цепей и $\pi \rightarrow \pi^*$ -полосы пептидной группы), так что оптическая плотность белкового раствора с концентрацией $1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ составит $A_{230} = 3$. Однако многие из используемых растворителей также поглощают при этой длине волны, что существенно усложняет определение концентрации.

ПОГЛОЩЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ ОСНОВАНИЯМИ

Интенсивное поглощение всех нуклеиновых кислот в ближней УФ-области почти целиком обусловлено пуриновым и пиримидиновым основаниям. Сахарофосфатный остов РНК и ДНК дает незначительный вклад в спектр поглощения при длинах волн, превышающих 200 нм. Несмотря на это свободные основания не могут служить совершенными моделями хромофоров нуклеиновых кислот. Отсутствие гликозидной C—N-связи вызывает значительное возмущение электронных состояний. Например, свободные пурины могут претерпевать таутомерные превращения вследствие перемещения протона между атомами азота в положениях 9 и 7 . Более приемлемыми модельными соединениями являются N^9 -метилпурины и N^1 -метилпиримидины. Спектры этих веществ весьма близки к спектрам нуклеозидов.

Спектры четырех нуклеозидов в воде при pH 7 выглядят обманчиво просто (рис. 7.12). Однако электронная структура пуринов и пиримидинов гораздо сложнее, чем белковых хромофорных групп. Основания имеют очень низкую симметрию и много несвязывающих электронов. Сопоставление со спектрами ряда более простых молекул показывает, что у всех оснований в области от 200 до 300 нм должно проявляться несколько разных $\pi \rightarrow \pi^*$ - и $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходов. Кажущиеся простыми полосы поглощения аденина и урацила с $\lambda_{\max} = 260$ нм, имеющие вид гауссовых кривых, в действительности порождаются более чем одним переходом. G и C, имеющие на первый взгляд лишь по две полосы, на самом деле, вероятно, обладают большим числом невыявленных полос.

Моменты переходов многих электронных полос оснований нуклеиновых кислот лежат в плоскости ароматических колец. Их направления, полученные теоретически или экспериментально, показаны на рис. 7.13. Ясно, что поглощение всех оснований в ближней

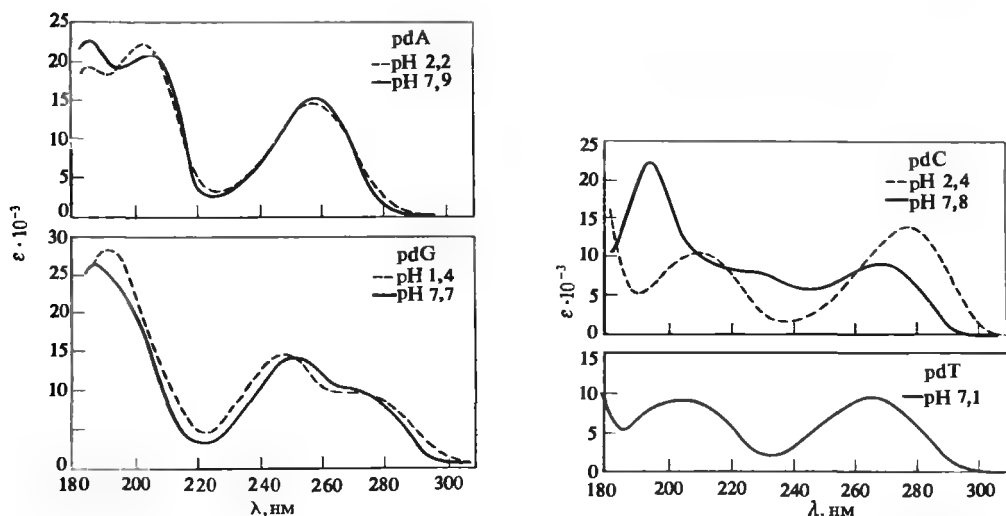


РИС. 7.12. Спектры поглощения четырех дезоксирибонуклеотидов как функция pH. Спектры рибонуклеотидов весьма близки к ним, за исключением спектра уридина (U), у которого $\lambda_{\text{max}} = 260$, а не 268 нм, как для dT. [D.Voet, W.B.Gratzer, R.A.Cox, P.Doty, Biopolymers, 1, 193 (1963).]

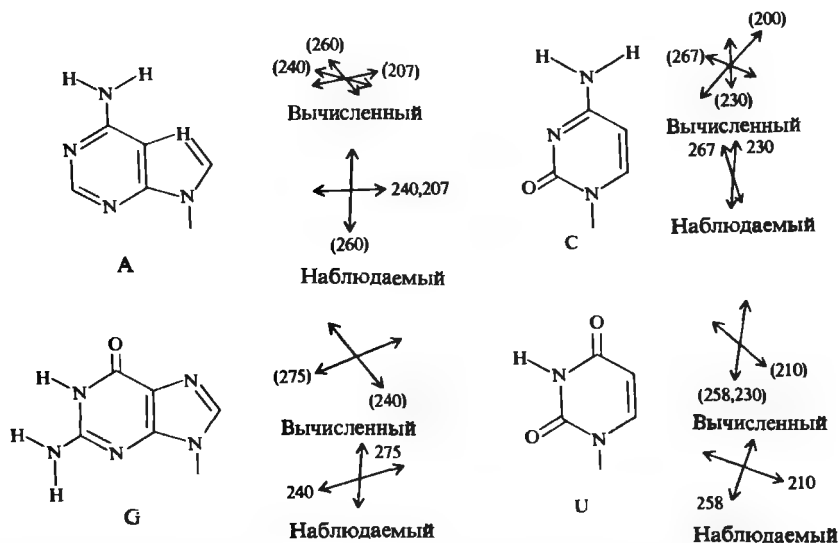


РИС. 7.13. Теоретические и наблюдаемые направления моментов переходов в N-алкилированных основаниях нуклеиновых кислот. [V.Bloomfield, D.Crothers, I.Tinoco, Jr., Physical Chemistry of Nucleic Acids, New York, Harper and Row, 1975, p.50.)

УФ-области обусловлено несколькими переходами. Это сильно усложняет анализ влияния конформации на спектры нуклеиновых кислот.

Спектры всех четырех нуклеозидов чувствительны к pH. Протонирование С и G приводит к значительному сдвигу поглощения в сторону больших длин волн (красное смещение). Депротонирование U или T при щелочных pH также приводит к существенному красному смещению максимума поглощения. Протонирование А сопровождается гораздо меньшими, но вполне поддающимися регистрации спектральными изменениями. Все эти эффекты весьма полезны для определения степени ионизации отдельных составляющих нуклеиновых кислот, однако в полимерах они становятся более сложными из-за сильного электронного взаимодействия между основаниями. Позже мы обсудим эту проблему. Присутствие фосфатных групп, по-видимому, не сказывается сколько-нибудь заметно на молярной экстинкции различных составляющих нуклеиновых кислот. Например, значения $\lambda_{\max}$ и $\varepsilon_{\max}$ для ATP, ADP, AMP, аденозина и 3'- или 2'-адениловой кислоты оказываются в пределах ошибки эксперимента одинаковыми.

Энергия длинноволновых, достаточно интенсивных электронных переходов пяти наиболее распространенных оснований почти одинакова. Это служит серьезным препятствием для детального анализа электронных спектров ДНК и РНК. Полосы поглощения отдельных хромофоров типичной нуклеиновой кислоты сливаются и дают простую на вид полосу с $\lambda_{\max} \approx 260$ нм (рис. 7.14). Свойства отдельных оснований оказываются весьма близкими, так что даже в отсутствие достаточно сильного взаимодействия между основаниями трудно представить полосу поглощения с $\lambda_{\max} = 260$ нм для нуклеиновой кислоты в виде суммы четырех составляющих с определенными весами.

Средний коэффициент молярной экстинкции при 260 нм в расчете на моль нуклеозидов примерно равен $1,0 \cdot 10^4$. Следовательно, для получения хорошей точности при регистрации спектров поглощения нуклеиновых кислот в УФ-области концентрация последних

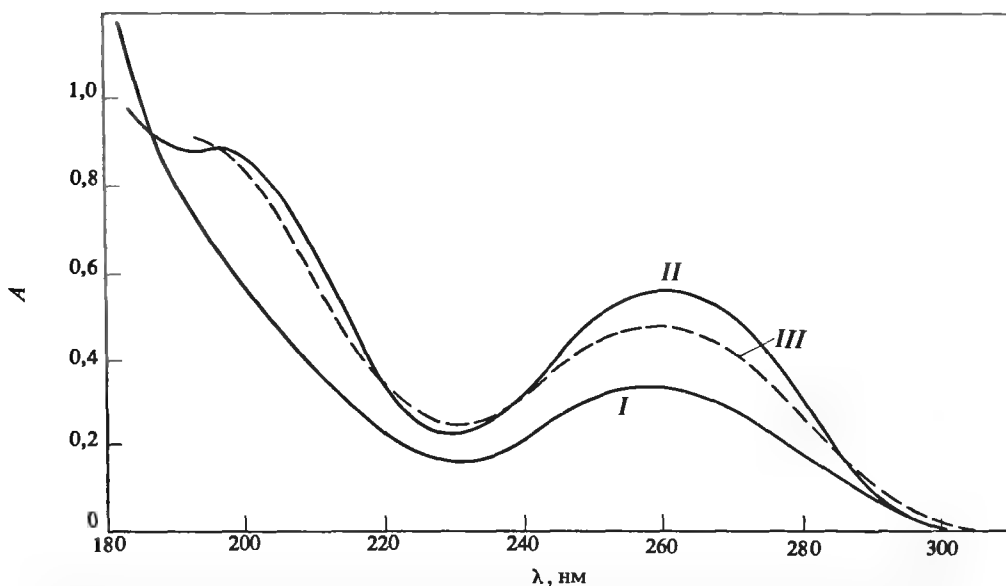


РИС. 7.14. Спектр поглощения ДНК как функция температуры. После расщепления ДНК ферментами в растворе должны присутствовать только мононуклеотиды и, возможно, небольшое количество коротких олигомеров. Обратите внимание, что спектр, измеренный при высокой температуре, очень близок к спектру препарата, обработанного ферментами. I — нативная ДНК, 25°C; II — препарат, обработанный ферментами; III — ДНК *E.coli*, 82°C. [D.Voet, W.B.Gratzer, R.A.Cox, P.Doty, Biopolymers, 1, 193 (1963).]

должна быть порядка $3 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$. Такая весьма высокая чувствительность позволяет использовать измерение УФ-поглощения во множестве аналитических методов. Необычные основания, присутствующие в тРНК в малом количестве, обладают длинноволновыми переходами, заметно смещенными в красную область по сравнению с обычными основаниями нуклеиновых кислот: это основания У ($\lambda_{\text{max}} = 325 \text{ нм}$) и 4-тиоуридин ($\lambda_{\text{max}} = 340 \text{ нм}$). Поскольку обычные основания практически не поглощают при этих длинах волн, минорные основания можно изучать независимо, производя измерения при $\lambda > 300 \text{ нм}$. Однако и здесь Природа оказалась не слишком великодушной, так как коэффициенты экстинкции этих оснований невелики, а их содержание (если они вообще присутствуют в данной молекуле) обычно в 80 раз меньше, чем обычных оснований в тРНК. Таким образом, для точных измерений при $\lambda > 300 \text{ нм}$ необходимо иметь образцы с гораздо более высокой концентрацией.

Взаимодействия между белками и нуклеиновыми кислотами имеют огромное биологическое значение. Поэтому изучение физических аспектов этих взаимодействий представляет очень большой интерес, и применение абсорбционной спектроскопии может в принципе оказаться здесь весьма полезным. Однако все сказанное выше свидетельствует о сложности одновременного исследования белков и нуклеиновых кислот в смеси. Рассмотрим взаимодействие между тРНК с мол. массой 25 000 ($\epsilon_{260} \approx 560\,000$) и аминокил-тРНК—синтетазой с мол. массой 100 000 ($\epsilon_{280} \approx 100\,000$). Несмотря на четырехкратное превосходство синтетазы по массе, спектр поглощения в ближней УФ-области будет определяться в основном тРНК. И хотя отношение A_{280}/A_{260} позволяет судить об относительных количествах белка и нуклеиновой кислоты, более детальный анализ спектра с целью выявления их индивидуальных свойств очень сложен, так как полосы поглощения белка сильно перекрываются с более интенсивными полосами поглощения тРНК.

7.4. Влияние конформации на поглощение

Как сказывается на оптических свойствах хромофоров белка или нуклеиновой кислоты то, что они являются частью полимера? К чему приводит воздействие на них со стороны других звеньев полимерной цепи? Для простоты рассмотрим полимер с регулярной структурой, например спиральной, где все звенья имеют одинаковое окружение. Сравним спектр поглощения двойной спирали ДНК со спектром, ожидаемым для смеси ее мономерных составляющих. Последний может быть представлен как $C \sum_i \chi_i \epsilon_i$ —сумма взвешенных спектров мономеров, где χ_i —молярная доля остатка i -го типа, C —суммарная концентрация мономерных остатков, а ϵ_i —известная молярная экстинкция чистого мономера i -го типа. Однако проще расщепить ДНК на смесь мономеров при помощи ферментов. Спектр получающейся при этом смеси, а также спектр нативной двухцепочечной ДНК в В-форме приведены на рис. 7.14. Несмотря на качественное сходство, спектры заметно различаются в количественном отношении. Эти различия могли возникнуть из-за того, что полимер обладает определенной конформацией, или из-за образования между мономерами ковалентных связей. Если разрушить двойную спираль путем нагревания до 90°C , то мы получим спектр (также показанный на рис. 7.14), весьма близкий к спектру мономеров. Для строгости сравнения следовало бы, конечно, снять и спектр мономеров при 90°C , однако поглощение свободных мономеров фактически не зависит от температуры. Обычно отличие спектра поглощения полимера от спектра его простых мономерных единиц определяется главным образом конформацией полимера. В случае полипептидов мономерным звеном следует считать пептидную группу, поскольку свободные аминокислоты не имеют пептидного хромофора.

Оптические свойства хромофоров могут изменяться при образовании полимерной структуры по нескольким причинам. Геометрия хромофора может искажаться из-за силь-

ного взаимодействия с другими группами. Такие примеры известны, но они крайне редки, и мы не будем их рассматривать¹⁾. Все остальные возможности относятся к разряду более слабых взаимодействий. Свойства хромофоров могут меняться в зависимости от локального окружения или от взаимодействия его с соседними хромофорами. Рассмотрим сначала обычный эффект окружения. Это может быть влияние и локального pH, и диэлектрической проницаемости, и жесткости среды, и наличия соседних групп, способных вступать в специфические химические взаимодействия (такие, как перенос заряда или протона, связывание с ионом металла). Мы остановимся здесь только на влиянии полярности растворителя.

ВЛИЯНИЕ НА СПЕКТРЫ ЛОКАЛЬНОГО ОКРУЖЕНИЯ ХРОМОФОРОВ

Спектры многих хромофоров зависят от растворителя. Эта зависимость может проявляться в изменении интенсивности, формы полос или длины волны, при которой наблюдается максимум поглощения. Когда свободные хромофоры (скажем, триптофан) находятся в водном растворе, окружающей средой для них является, вообще говоря, вода. Это справедливо и для триптофана, расположенного на поверхности белковой молекулы. Однако из-за довольно сильно выраженной гидрофобности триптофана его боковая группа будет, как правило, спрятана в глубине белковой молекулы, где ее окружение ближе всего к углеводородному растворителю, а вовсе не к водному раствору.

Резкие изменения окружения хромофора, например замена полярной среды на неполярную, оказывают существенное влияние на разность энергий между электронными состояниями и, следовательно, на $\lambda_{\max}$ полосы поглощения. В общем случае влияние растворителя должно проявляться в понижении средней энергии любого уровня. Взаимодействия между растворителем и растворенным веществом чаще происходят при взаимных ориентациях, благоприятствующих притяжению, чем при ориентациях, способствующих отталкиванию, подобно тому как молекула с большей вероятностью будет находиться в конформации с низкой энергией, чем в высокоэнергетической конформации. Чем больше полярность растворителя, тем сильнее должны быть эти взаимодействия. Однако для того, чтобы произошел сдвиг частоты поглощения, необходимо изменить относительную энергию двух состояний.

Количественный анализ влияния растворителя на спектр поглощения представляет собой чрезвычайно трудную задачу. Когда хромофор находится в основном состоянии, молекулы растворителя располагаются так, чтобы их энергия была минимальной. Процесс возбуждения происходит за время порядка 10^{-15} с, что значительно меньше характерных времен молекулярных движений. Таким образом, чтобы вычислить длину волны, при которой будет наблюдаться поглощение, нужно знать энергию *возбужденного* хромофора при конфигурации молекул растворителя, присущей *основному состоянию*. В таких вычислениях необходимо учитывать два фактора: высокочастотную диэлектрическую проницаемость (определяемую поляризуемостью) и постоянный дипольный момент. Эти факторы различаются тем, что эффекты, связанные с поляризуемостью, проявляются достаточно быстро в ответ на перераспределение электронов при возбуждении, в то время как эффекты, связанные с постоянным дипольным моментом, характеризуются гораздо большими временами.

¹⁾ Примером может служить определяющая роль третичной структуры в образовании двугранных углов дисульфидных связей.

Таблица 7.3

ПОГЛОЩЕНИЕ МЕЗИТИЛОКСИДА В БЛИЖНЕЙ УФ-ОБЛАСТИ¹⁾

Растворитель	$n \rightarrow \pi^*$		$\pi \rightarrow \pi^*$	
	$\lambda, \text{нм}$	$\varepsilon_{\text{max}} \cdot 10^{-3}$	$\lambda, \text{нм}$	$\varepsilon_{\text{max}} \cdot 10^{-1}$
Гексан	229,5	12,6	327	9,8
Этанол	237	12,6	315	7,8
Вода	244,5	10,0	305	6,0

¹⁾ M. Orchin, H. N. Jaffe, Theory and Applications of Ultraviolet Spectroscopy, New York, Wiley, 1960.

Когда преобладают эффекты поляризуемости, ясно, что в полярном растворителе будет преимущественно уменьшаться энергия электронного состояния хромофора с наибольшим дипольным моментом. Поскольку этим состоянием почти всегда является возбужденное состояние, мы приходим к выводу, который, как вскоре будет показано, справедлив для $\pi \rightarrow \pi^*$ — переходов: в полярных растворителях спектр поглощения сдвигается в сторону больших длин волн.

Предсказать направление спектрального сдвига, обусловленного влиянием растворителя, становится чрезвычайно трудно, когда имеет место сильное диполь-дипольное взаимодействие между молекулами растворителя и растворенного вещества. Молекулы растворителя не могут переориентироваться в ходе поглощения, и их ориентация относительно молекул растворенного вещества, которая в основном состоянии отвечала взаимному притяжению, в возбужденном может соответствовать еще большему притяжению, его исчезновению или даже отталкиванию. [Подробнее см. J. Birks, 1970, p. 109; R. Marcus, J. Chem. Phys., 43, 1261 (1965).]

В качестве простой иллюстрации влияния растворителя рассмотрим хромофор мезитил-оксид: $(\text{CH}_3)_2\text{C} = \text{C} - \text{CO} - \text{CH}_3$. Поглощение этой молекулы в ближней УФ-области обусловлено переходами между тремя уровнями: π , π^* и n . Наиболее низкоэнергетически являются переходы $\pi \rightarrow \pi^*$ и $n \rightarrow \pi^*$. Мы рассмотрим влияние растворителя, связанное только с поляризуемостью. Поскольку π -орбиталь является связывающей, электрон на этой орбитали будет находиться главным образом между ядрами связанных атомов, и его энергия должна изменяться под влиянием растворителя меньше, чем энергия электрона, находящегося на разрыхляющей π^* -орбитали. Замена неполярного растворителя на полярный приведет к уменьшению разности энергий π - и π^* -орбиталей и вызовет красное смещение спектров поглощения (табл. 7.3; рис. 7.15). Находясь на n -орбитали, электрон будет взаимодействовать с растворителем сильнее, чем даже электрон π^* -орбитали. Заполненные n -орбитали могут служить, например, акцепторами при образовании водородных связей. Следовательно, можно сделать вывод, что в более полярном растворителе разность энергий между n - и π^* -уровнями будет возрастать, приводя к сдвигу спектра в сторону меньших длин волн (голубое смещение).

На основании приведенных примеров, казалось бы, можно заключить, что спектры поглощения белков в ближней УФ-области должны быть сдвинуты в сторону меньших длин волн по отношению к сумме спектров свободных аминокислот в водном растворе. В обла-

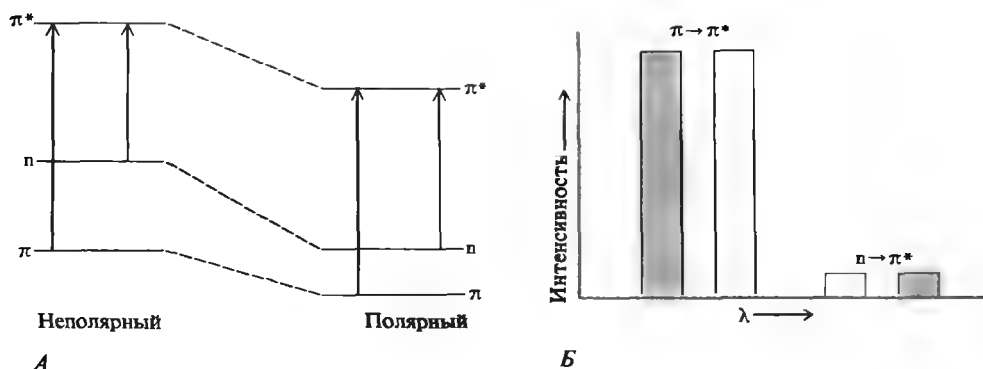


РИС. 7.15. Влияние полярности растворителя на энергию $\pi \rightarrow \pi^*$ - и $n \rightarrow \pi^*$ -переходов. А. Уровни энергии. Б. Схематическое изображение спектров для полярного (незакрашенные прямоугольники) и неполярного (закрашенные прямоугольники) растворителей.

сти от 250 до 300 нм преобладают $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходы. По крайней мере некоторые ароматические группы находятся в неполярном окружении, создаваемом белковой молекулой. Можно было бы ожидать, что путем тщательного анализа формы и положения полос поглощения белка удастся найти число «спрятанных» и экспонированных ароматических остатков. В действительности все обстоит гораздо сложнее. Например, спектр бычьего сывороточного альбумина сдвинут на 3 нм в красную сторону по сравнению со спектром смеси аминокислот при кислых рН, но этот сдвиг трудно интерпретировать. Поскольку свободные аминокислоты заряжены, они не могут служить хорошими моделями аминокислотных остатков в белке. Окружение внутри белковой молекулы не такое однородное, изотропное и неполярное, как скажем, в растворе циклогексана. Кроме эффектов поляризуемости теперь необходимо учитывать и эффекты, связанные с наличием дипольного момента. Ароматические боковые группы часто оказываются вовлеченными в специфические взаимодействия со своими полярными соседями; например, они образуют водородные связи с атомами пептидного остова или других полярных групп. Поэтому форма УФ-спектра в области, отвечающей поглощению ароматических молекул, несколько различается для разных белков. Анализ влияния окружения с целью объяснить эти специфические структурные детали оказывается весьма затруднительным.

Спектральный анализ требует не столь прямолинейного подхода. Весьма успешным оказался метод спектроскопии «возмущения растворителем», при котором регистрируют спектры (или разностные спектры) в постепенно изменяющейся последовательности растворителей. Такую последовательность получают, добавляя небольшими порциями слабо полярный растворитель (например, этанол). Если при этом в белке не происходит конформационных перестроек, его спектральные свойства будут плавно изменяться. Следя лишь за изменениями спектра, можно исследовать свойства экспонированных остатков, которые и «чувствуют» состав растворителя. Эти изменения носят сходный характер для различных белков, поскольку на внешнем окружении не сказываются детали структуры белка. Для остатков триптофана и тирозина были получены эталонные кривые спектральных изменений, связанных с изменением состава растворителя. Пользуясь этими кривыми, можно определить, какие ароматические остатки расположены на поверхности разных белковых молекул. Зная общий аминокислотный состав, можно затем найти число спрятанных остатков.

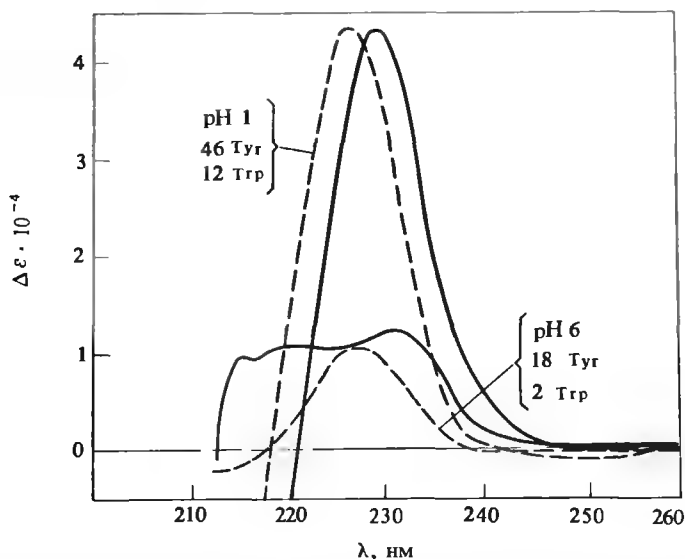


РИС. 7.16. Разностные спектры при «возмущении растворителем» для альдолазы из мышц кролика; состав растворителя изменяли путем добавления этиленгликоля до концентрации 20%. Приведены наблюдаемые спектры (сплошные кривые) и разностные спектры, построенные на основании спектров отдельных аминокислот (штриховые кривые). Очевидно, что при pH 6 число экспонированных групп в белке значительно меньше, чем при pH 1. [J.W.Donovan, J.Biol. Chem., 244, 1961 (1969).]

На рис. 7.16. приведены спектры при возмущении растворителем для альдолазы. При pH 6 экспонированы два ароматических остатка: Trp-2 и Tyr-18. Изменения состава сопровождаются довольно резкими спектральными изменениями, т.е. в молекуле белка происходят конформационные перестройки. При еще более высоких концентрациях неполярного растворителя вновь можно следить за экспонированными остатками, однако следует помнить, что белок в этих условиях не является нативным. Из рис. 7.16 видно, что при pH 1 число экспонированных ароматических остатков в альдолазе гораздо больше, чем при pH 6, т.е. при pH 1 белок обладает весьма развернутой конформацией.

Чувствительность ароматических хромофоров к составу растворителя является чрезвычайно полезным свойством. Даже в тех случаях, когда спектры оказываются очень сложными для анализа, спектральные изменения могут с успехом использоваться для выявления конформационных перестроек. В последующих главах мы рассмотрим много таких примеров.

В случае нуклеиновых кислот методы возмущения растворителем применять гораздо труднее. Среди взаимодействий, проявляющихся в спектрах поглощения, главную роль играют взаимодействия между основаниями. Кроме того, структура этих молекул меняется слишком легко при изменении состава растворителя. Некоторых успехов удалось достичь благодаря замене растворителя — H_2O на D_2O . Однако происшедшие спектральные изменения были очень незначительны и с трудом поддавались анализу.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ РАЗНЫМИ ХРОМОФОРАМИ

Перейдем теперь от рассмотрения влияния окружения к вопросу о том, что произойдет при сближении хромофоров на расстояние, при котором между ними становится возмож-

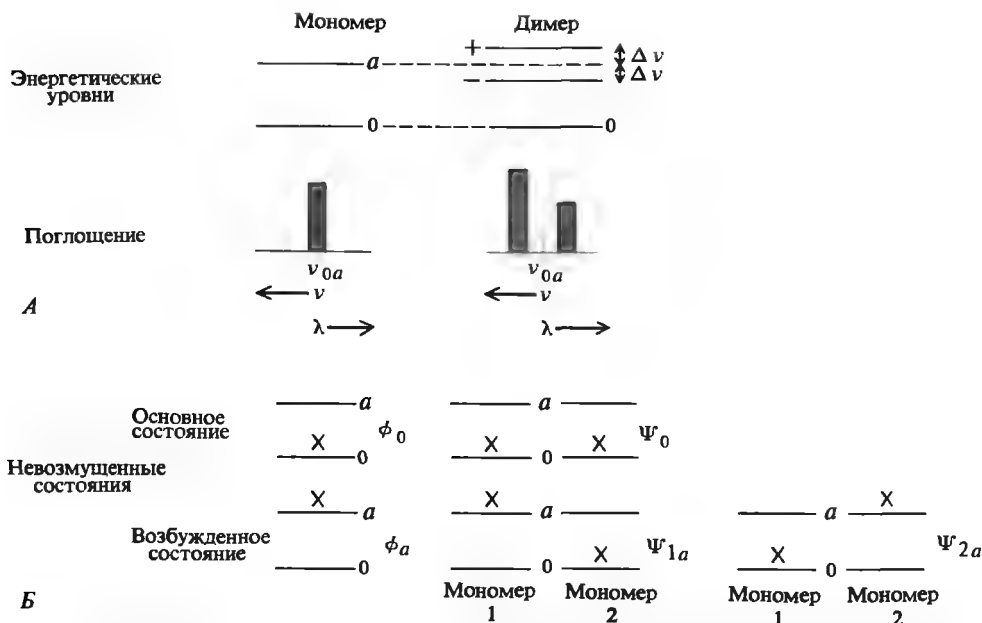


РИС. 7.17. Энергетические уровни, состояния и спектры поглощения мономера и димера из двух одинаковых хромофоров. *А*. В результате электронных взаимодействий возбужденный уровень мономера расщепляется на два уровня. Интенсивности поглощения при переходах на эти два уровня обычно различаются. *Б*. Состояния и волновые функции для мономера и для димера, в котором мономеры не взаимодействуют.

ным электронное взаимодействие. Подобное взаимодействие имеет место как между основаниями в составе нуклеиновых кислот или полинуклеотидов, так и между пептидными хромофорами белков или полипептидов. Реже такое взаимодействие наблюдается между ароматическими аминокислотными остатками, так как обычно их содержание в белке невелико. Для простоты мы сначала рассмотрим очень простую ситуацию: димер из двух одинаковых хромофоров. Последующее рассмотрение можно легко обобщить на более сложные случаи. Будем считать, что мономерный хромофор обладает лишь двумя электронными состояниями, 0 и a , и одной полосой поглощения, связанной с переходом его из состояния 0 в состояние a . Будем считать, что полоса поглощения — это просто линия при частоте $\nu_{0a} = (E_a - E_0)/h$. Основному состоянию соответствует волновая функция ϕ_0 , возбужденному — ϕ_a . Эти функции ортогональны и нормированы: $\langle \phi_0 | \phi_0 \rangle = \langle \phi_a | \phi_a \rangle = 1$; $\langle \phi_a | \phi_0 \rangle = 0$. Интенсивность поглощения мономера будет определяться квадратом момента перехода $|\langle \phi_0 | \mu | \phi_a \rangle|^2$.

В случае димера, содержащего два таких мономерных хромофора, в общем случае будут наблюдаться две полосы поглощения: одна при частоте на $\Delta\nu$, большей, чем частота поглощения мономера, другая — на $\Delta\nu$ меньшей, причем интенсивности этих двух полос не обязательно будут одинаковы (рис. 7.17). Попытаемся объяснить этот экспериментальный факт.

● ДИМЕР, СОСТОЯЩИЙ ИЗ НЕВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ МОНОМЕРОВ

Опишем вначале состояния димера, в котором взаимодействие между мономерами отсутствует. В основном состоянии димер состоит из мономеров, каждый из которых пре-

бывает в своем основном состоянии. Волновая функция для димера запишется в виде произведения волновых функций отдельных мономеров, находящихся в основном состоянии: ϕ_{10} и ϕ_{20} [см. выражение (7.6)]. Таким образом, волновой функцией основного состояния димера будет $\Psi_0 = \phi_{10}\phi_{20}$. Димер, находящийся в первом возбужденном состоянии, будет состоять из мономера в состоянии a и мономера в состоянии 0 (рис. 7.17). Имеются две возможности описать это состояние: $\Psi_{1a} = \phi_{1a}\phi_{20}$ (в возбужденном состоянии находится первый мономер) и $\Psi_{2a} = \phi_{10}\phi_{2a}$ (в возбужденном состоянии находится второй мономер). Заметим, что эти два состояния обладают взаимно ортогональными волновыми функциями: $\langle \phi_{1a}\phi_{20} | \phi_{10}\phi_{2a} \rangle = 0$. Вторым возбужденным состоянием димера будет состояние с волновой функцией $\phi_{1a}\phi_{2a}$. Его энергии отстоит от энергии основного состояния вдвое дальше, чем энергии состояний с волновыми функциями Ψ_{1a} и Ψ_{2a} . Максимум полосы поглощения, обусловленного переходом из основного во второе возбужденное состояние, будет находиться при таких коротких длинах волн, что мы можем не рассматривать в дальнейшем это состояние.

Энергия различных состояний димера вычисляется как собственные значения его гамильтониана, $\underline{H} = \underline{H}_1 + \underline{H}_2$, где $\underline{H}_1$ и $\underline{H}_2$ — гамильтонианы мономеров 1 и 2 соответственно. Имеют место следующие соотношения:

$$\underline{H}_1\phi_{10} = E_0\phi_{10}, \quad \underline{H}_1\phi_{1a} = E_a\phi_{1a} \quad (7.43a)$$

$$\underline{H}_2\phi_{20} = E_0\phi_{20}, \quad \underline{H}_2\phi_{2a} = E_a\phi_{2a} \quad (7.43b)$$

Следовательно, энергия димера будет равна:

основное состояние с волновой функцией Ψ_0

$$\begin{aligned} \text{Энергия} &= \langle \phi_{10}\phi_{20} | \underline{H}_1 + \underline{H}_2 | \phi_{10}\phi_{20} \rangle \\ &= \langle \phi_{20} | \phi_{20} \rangle \langle \phi_{10} | \underline{H}_1 | \phi_{10} \rangle + \langle \phi_{10} | \phi_{10} \rangle \langle \phi_{20} | \underline{H}_2 | \phi_{20} \rangle \\ &= E_0 + E_0 = 2E_0 \end{aligned} \quad (7.44a)$$

возбужденное состояние с волновой функцией Ψ_{1a}

$$\begin{aligned} \text{Энергия} &= \langle \phi_{1a}\phi_{20} | \underline{H}_1 + \underline{H}_2 | \phi_{1a}\phi_{20} \rangle \\ &= E_a + E_0 \end{aligned} \quad (7.44b)$$

возбужденное состояние с волновой функцией Ψ_{2a}

$$\begin{aligned} \text{Энергия} &= \langle \phi_{10}\phi_{2a} | \underline{H}_1 + \underline{H}_2 | \phi_{10}\phi_{2a} \rangle \\ &= E_0 + E_a \end{aligned} \quad (7.44b)$$

Два возбужденных состояния с волновыми функциями Ψ_{1a} и Ψ_{2a} имеют одинаковую энергию. Разность энергий основного и любого из них в точности равна $E_a - E_0$. Следовательно, и частота поглощения димера будет точно такой же, как у мономера. Однако интенсивность поглощения димера будет вдвое больше, так как он содержит два мономера. Мы можем найти интенсивность поглощения, которая пропорциональна квадрату момента перехода, воспользовавшись выражением для оператора дипольного момента димера: $\underline{\mu} = \underline{\mu}_1 + \underline{\mu}_2$.

Например,

$$|\langle \Psi_0 | \underline{\mu} | \Psi_{1a} \rangle|^2 = |\langle \phi_{10}\phi_{20} | \underline{\mu}_1 + \underline{\mu}_2 | \phi_{1a}\phi_{20} \rangle|^2 = |\langle \phi_{10} | \underline{\mu}_1 | \phi_{1a} \rangle|^2 = D_{0a} \quad (7.45)$$

Таким образом, вклад в поглощение состояния с волновой функцией Ψ_{1a} в точности равен поглощению изолированного мономера. Такой же вклад дает состояние с волновой функцией Ψ_{2a} .

Заметим, что в случае димера $\underline{H}$ и $\underline{\mu}$ являются просто суммой операторов для отдельных мономеров. Следовательно, интегралы в уравнениях (7.44) и (7.45) всегда могут быть представлены в виде суммы или произведения интегралов, относящихся к мономерам. Волновые функции Ψ_{1a} и Ψ_{2a} описывают состояние димера, у которого энергия возбуждения локализована на одном из мономеров. Возбужденное состояние димера можно описать также с помощью волновой функции $C_1\Psi_{1a} + C_2\Psi_{2a}$, допуская тем самым, что нам неизвестна действительная структура возбуждения. Такая волновая функция также будет решением уравнения Шредингера для димера:

$$(\underline{H}_1 + \underline{H}_2)(C_1\Psi_{1a} + C_2\Psi_{2a}) = (E_a + E_0)(C_1\Psi_{1a} + C_2\Psi_{2a}) \quad (7.46)$$

Следовательно, измеряя поглощение при частоте $\nu_{0a} = (E_a - E_0)/h$, мы не можем сказать, какой из мономеров переходит в возбужденное состояние.

● ДИМЕР, СОСТОЯЩИЙ ИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ МОНОМЕРОВ

Предположим теперь, что момеры располагаются настолько близко друг к другу, что между ними возникает электронное взаимодействие. Будем рассматривать случай достаточно слабых взаимодействий, при котором момеры сохраняют свою индивидуальность, т.е. электроны локализованы либо на одном, либо на другом мономере, но каждый из них подвергается возмущению со стороны электрического поля другого. Поскольку момеры не заряжены, основной вклад в их электронное взаимодействие будет вносить диполь-дипольное взаимодействие, описываемое точно так же, как взаимодействие мономерных звеньев, входящих в состав полимера в основном состоянии (гл. 5). Гамильтониан для димера приобретает следующий вид:

$$\underline{H} = \underline{H}_1 + \underline{H}_2 + \underline{V} \quad (7.47)$$

Здесь $\underline{H}_1$ и $\underline{H}_2$ — гамильтонианы для мономеров, точно такие же, как и в случае невзаимодействующих мономеров, а $\underline{V}$ — оператор, описывающий диполь-дипольное взаимодействие:

$$\underline{V} = (\underline{\mu}_1 \cdot \underline{\mu}_2) \underline{R}_{12}^{-3} - 3(\underline{\mu}_1 \cdot \underline{R}_{12})(\underline{R}_{12} \cdot \underline{\mu}_2) \underline{R}_{12}^{-5} \quad (7.48)$$

где $\underline{\mu}_1$ и $\underline{\mu}_2$ — операторы дипольных моментов мономеров 1 и 2 соответственно, а $\underline{R}_{12}$ — расстояние между мономерами. Строго говоря, это расстояние следует брать между центрами электронной плотности мономеров, но на практике достаточно хорошим приближением часто оказывается расстояние между их геометрическими центрами.

Для нахождения электронных состояний димера необходимо решить уравнение Шредингера с гамильтонианом, описываемым уравнением (7.47). Это трудная задача. Для простоты будем считать взаимодействие настолько слабым, что волновой функцией основного состояния по-прежнему будет Ψ_0 , а волновые функции вида Ψ_{1a} и Ψ_{2a} все еще смогут служить хорошим приближением для описания возбужденных состояний димера. Мы потребуем лишь, чтобы собственные функции для возбужденного состояния были стационарными. Это означает, что гамильтониан не должен предсказывать переходы между возбужденными состояниями. Заметим, что в случае двух *невзаимодействующих* димеров

$$\begin{aligned}\langle \Psi_{1a} | \underline{H} | \Psi_{2a} \rangle &= \langle \phi_{1a} \phi_{20} | \underline{H}_1 + \underline{H}_2 | \phi_{10} \phi_{2a} \rangle = \\ &= (E_0 + E_a) (\langle \phi_{1a} | \phi_{10} \rangle \cdot \langle \phi_{20} | \phi_{2a} \rangle) = 0\end{aligned}\quad (7.49)$$

Следовательно, волновые функции Ψ_{1a} и Ψ_{2a} являются стационарными. Однако для *взаимодействующих* мономеров

$$\langle \Psi_{1a} | \underline{H} | \Psi_{2a} \rangle = \langle \phi_{1a} \phi_{20} | \underline{H}_1 + \underline{H}_2 + \underline{V} | \phi_{10} \phi_{2a} \rangle = V_{12} \quad (7.50)$$

где V_{12} определяется следующим выражением [см. уравнение (7.48)]:

$$\begin{aligned}V_{12} &= \langle \phi_{1a} \phi_{20} | \underline{V} | \phi_{10} \phi_{2a} \rangle = \\ &= \left. \begin{aligned} &= (\langle \phi_{1a} | \underline{\mu}_1 | \phi_{10} \rangle \cdot \langle \phi_{20} | \underline{\mu}_2 | \phi_{2a} \rangle) R_{12}^{-3} - \\ &- (3 \langle \phi_{1a} | \underline{\mu}_1 | \phi_{20} \rangle \cdot \underline{R}_{12}) (\underline{R}_{12} \cdot \langle \phi_{20} | \underline{\mu}_2 | \phi_{2a} \rangle) R_{12}^{-5} \end{aligned} \right\} \quad (7.51)\end{aligned}$$

При наличии возмущения $\underline{V}$ волновые функции Ψ_{1a} и Ψ_{2a} уже не являются стационарными. Происходят быстрые переходы из одного состояния в другое. Эти переходы вызваны взаимодействиями между моментами переходов двух мономеров [уравнение (7.51)]. Колебания электрического поля одного мономера воспринимаются другими, вызывая перенос возбуждения. Заметим, что взаимодействие между двумя мономерами пропорционально R_{12}^{-3} , так что оно быстро убывает с увеличением расстояния между ними.

Поскольку мы все-таки хотим воспользоваться волновыми функциями Ψ_{1a} и Ψ_{2a} , будем искать такие их линейные комбинации ($C_1 \Psi_{1a} + C_2 \Psi_{2a}$ и $C'_1 \Psi_{1a} + C'_2 \Psi_{2a}$), которые удовлетворяют трем следующим условиям:

$$\left. \begin{aligned} \text{условие нормировки: } &\langle C_1 \Psi_{1a} + C_2 \Psi_{2a} | C_1 \Psi_{1a} + C_2 \Psi_{2a} \rangle = 1 \\ \text{условие ортогональности: } &\langle C_1 \Psi_{1a} + C_2 \Psi_{2a} | C'_1 \Psi_{1a} + C'_2 \Psi_{2a} \rangle = 0 \\ \text{условие стационарности: } &\langle C_1 \Psi_{1a} + C_2 \Psi_{2a} | \underline{H} | C'_1 \Psi_{1a} + C'_2 \Psi_{2a} \rangle = 0 \end{aligned} \right\}$$

Легко показать, что таких волновых функций только две:

$$\begin{aligned}\Psi_{A+} &= (1/\sqrt{2})(\Psi_{1a} + \Psi_{2a}) \\ \Psi_{A-} &= (1/\sqrt{2})(\Psi_{1a} - \Psi_{2a})\end{aligned}\quad (7.52)$$

Они являются наилучшим приближением для волновых функций возбужденного состояния димера, которые можно получить, используя невозмущенные волновые функции для мономера $\phi_{10} \phi_{2a}$ и $\phi_{1a} \phi_{20}$.

Энергию различных состояний димера теперь можно найти, определив собственные значения гамильтониана $\underline{H} = \underline{H}_1 + \underline{H}_2 + \underline{V}$. Используя полученные ранее результаты и последовательно вычисляя интегралы, докажете справедливость следующих соотношений.

Основное состояние

$$\langle \Psi_0 | \underline{H} | \Psi_0 \rangle = \langle \phi_{10} \phi_{20} | \underline{H}_1 + \underline{H}_2 + \underline{V} | \phi_{10} \phi_{20} \rangle = 2E_0 \quad (7.53a)$$

(интегралы вида $\langle \phi_{10} | \underline{\mu}_1 | \phi_{10} \rangle$, входящие в слагаемое с $\underline{V}$, представляют собой постоянные дипольные моменты мономеров; для простоты мы полагаем их равными нулю).

Возбужденное состояние A^+

$$\begin{aligned}\langle \Psi_{A^+} | \mathbf{H} | \Psi_{A^+} \rangle &= (1/2) \langle \phi_{1a} \phi_{20} + \phi_{10} \phi_{2a} | \mathbf{H}_1 + \mathbf{H}_2 + \mathbf{V} | \phi_{1a} \phi_{20} + \phi_{10} \phi_{2a} \rangle = \\ &= E_a + E_0 + V_{12}\end{aligned}$$

Возбужденное состояние A^-

$$\begin{aligned}\langle \Psi_{A^-} | \mathbf{H} | \Psi_{A^-} \rangle &= (1/2) \langle \phi_{1a} \phi_{20} - \phi_{10} \phi_{2a} | \mathbf{H}_1 + \mathbf{H}_2 + \mathbf{V} | \phi_{1a} \phi_{20} - \phi_{10} \phi_{2a} \rangle = \\ &= E_a + E_0 - V_{12}\end{aligned}\quad (7.536)$$

Таким образом, два однократно возбужденных состояния димера больше не обладают одинаковой энергией. Говорят, что возмущение $\mathbf{V}$ расщепляет возбужденное состояние димера на два состояния. Величина расщепления составляет $2V_{12}$. Как явствует из уравнения (7.51), она является функцией расстояния между мономерами и зависит от их взаимной ориентации.

Частоты полос поглощения, соответствующих переходам $\Psi_0 \rightarrow \Psi_{A^+}$ и $\Psi_0 \rightarrow \Psi_{A^-}$, равны

$$\begin{aligned}\nu_+ &= (1/h)(E_a + E_0 + V_{12} - 2E_0) = \nu_{0a} + V_{12}/h \\ \nu_- &= (1/h)(E_a + E_0 - V_{12} - 2E_0) = \nu_{0a} - V_{12}/h\end{aligned}\quad (7.54)$$

Итак, разность частот двух полос поглощения, появившихся в результате расщепления исходной полосы, будет в точности равна $2V_{12}/h$. Это расщепление носит название *экситонного расщепления*, так как оно имеет ту же природу, что и аналогичное расщепление, впервые наблюдавшееся в оптических спектрах кристаллов, где происходит коллективное возбуждение. В случае таких систем нельзя говорить о возбуждении какого-то определенного хромофора, поскольку возбуждение охватывает сразу несколько хромофоров.

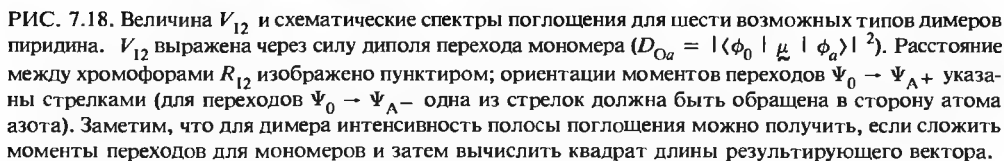
Рассмотрим теперь интенсивности переходов с частотами ν_+ и ν_- . Для нахождения квадратов моментов переходов вновь воспользуемся волновыми функциями. Мы можем найти D_{0A^+} и D_{0A^-} одновременно, беря знак плюс в приведенном ниже выражении для первого случая и минус для второго:

$$\begin{aligned}D_{0A^+} &= |\langle \Psi_0 | \mathbf{\mu}_1 + \mathbf{\mu}_2 | \Psi_{A^+} \rangle|^2 \\ &= |(1/\sqrt{2}) \langle \phi_{10} \phi_{20} | \mathbf{\mu}_1 + \mathbf{\mu}_2 | \phi_{1a} \phi_{20} \pm \phi_{10} \phi_{2a} \rangle|^2 \\ &= (1/2) |\langle \phi_{10} | \mathbf{\mu}_1 | \phi_{1a} \rangle \pm \langle \phi_{20} | \mathbf{\mu}_2 | \phi_{2a} \rangle|^2 \\ &= (1/2) [|\langle \phi_{10} | \mathbf{\mu}_1 | \phi_{1a} \rangle|^2 + |\langle \phi_{20} | \mathbf{\mu}_2 | \phi_{2a} \rangle|^2 \pm 2(\langle \phi_{10} | \mathbf{\mu}_1 | \phi_{1a} \rangle \cdot \langle \phi_{20} | \mathbf{\mu}_2 | \phi_{2a} \rangle)]\end{aligned}\quad (7.55)$$

Первые два слагаемых есть не что иное, как силы диполей для мономеров $D_{0\alpha_i}$. Более того, поскольку $|\langle \phi_{10} | \mathbf{\mu}_1 | \phi_{1a} \rangle| = |\langle \phi_{20} | \mathbf{\mu}_2 | \phi_{2a} \rangle| = \sqrt{D_{0\alpha_i}}$, мы можем выразить дипольные силы димера через наблюдаемые спектральные характеристики мономера:

$$D_{0A^+} = D_{0a} \pm D_{0a} \cos \theta \quad (7.56)$$

где θ — угол между моментами переходов, отвечающих поглощению отдельных мономеров 1 и 2. Из выражения (7.56) следует, что относительные интенсивности двух полос поглощения зависят от геометрии димера очень простым образом. Оно также показывает, что полная интегральная интенсивность поглощения димера не зависит от его геометрии и равна $D_{0A^+} + D_{0A^-} = 2D_{0a}$, т.е. удвоенной интенсивности поглощения мономера.



КАК АНАЛИЗИРОВАТЬ СПЕКТР ДИМЕРА

Перечислим вначале основные выводы, которые мы получили в предыдущем разделе. Каждая из полос поглощения мономера при образовании димера расщепляется на две полосы. Разность частот этих полос зависит как от расстояния между мономерами, так и от их взаимной ориентации. Интенсивности полос, D_{0A+} и D_{0A-} , являются функциями только угла между моментами переходов мономеров. Эти интенсивности можно выразить через интенсивность поглощения свободного мономера D_{0a} .

Состояниям A^+ и A^- можно дать простое физическое толкование. При переходе $\Psi_0 \rightarrow \Psi_{A+}$ момеры возбуждаются в фазе. Это означает, что их моменты переходов колеблются синфазно. При переходе $\Psi_0 \rightarrow \Psi_{A-}$ момеры возбуждаются в противофазе. Если сопоставить направления моментов переходов мономеров, которыми они обладают каждый в своей системе координат, то окажется, что эти направления противоположны. Суммарный спектр зависит от угла между моментами переходов (определяемого геометрией димера) и от взаимной фазы их возбуждения (зависящей от того, в какое из двух состояний, A^+ или A^- , совершается переход). Чтобы лучше усвоить все сказанное, рассмотрим спектры поглощения димеров, находящихся в различных простых конфигурациях (рис. 7.18).

В первых двух случаях (A и B) угол θ равен 0° и, значит, $\cos \theta = 1$; следовательно, $D_{0A+} = 2D_{0a}$, а $D_{0A-} = 0$ ¹⁾. Интенсивность поглощения определяется только переходом $\Psi_0 \rightarrow \Psi_{A+}$ [см. уравнение (7.56)]. Частота этого перехода определяется величиной V_{12} [см. уравнение (7.54)]. Для линейного — «голова к хвосту» — расположения мономеров (случай A) величина V_{12} отрицательна. Момеры притягиваются друг к другу, как и классические диполи при такой ориентации. Из уравнения (7.54) следует, что частота ν_+ меньше частоты ν_{0a} для мономера. Следовательно, будет наблюдаться красное смещение поглощения. Для параллельной стопки (случай B) величина V_{12} положительна, и поглощение проявится при частоте ν_+ , большей, чем для мономера.

В следующих двух случаях (B и Γ) $\theta = 180^\circ$, $\cos \theta = -1$, и, следовательно, $D_{0A-} = 2D_{0a}$, а $D_{0A+} = 0$. Момеры возбуждаются в противофазе. Интенсивность поглощения определяется переходом $\Psi_0 \rightarrow \Psi_{A-}$. Когда момеры располагаются «голова к голове» (случай B), величина V_{12} положительна (отталкивание), в то время как для антипараллельной стопки (случай Γ) $V_{12} < 0$ и момеры притягиваются. В случае B частота полосы поглощения ν_+ будет больше, чем для мономера, в случае Γ — меньше. Таким образом, в случае B спектр поглощения будет таким же, как и в случае A , а в случае Γ — как в случае B , хотя порождающие их состояния различаются. Заметим, что во всех этих случаях не наблюдается никакого спектрального расщепления, происходит только сдвиг максимума поглощения. Однако для любого угла, отличного от 0 или 180° , обычно наблюдаются две спектральные полосы.

В случае D димер представляет собой стопку мономеров, повернутых относительно друг друга на угол 90° , $\cos \theta$ равен нулю и переходы из состояния 0 в состояния A^+ и A^- совершаются с одинаковой вероятностью. Однако при такой геометрии величина V_{12} равна нулю. Отсутствие экситонного расщепления приводит к появлению точно такого же спектра, каким обладали бы два свободных мономера. В случае E момеры также расположены под углом 90° , но лежат в одной плоскости. При такой геометрии $\cos \theta$ опять равен нулю, но V_{12} в этом случае отрицательна. Следовательно, будут наблюдаться две одинаковые полосы — одна с меньшей частотой, ν_+ , другая с большей, ν_- . В таких благоприятных случаях, как этот, удастся измерить относительные интенсивности и величи-

¹⁾ Заметим, что $\theta = 0$ для обоих состояний A^+ и A^- . Угол θ определяется направлениями моментов переходов в мономеров. Он зависит от геометрии молекулы, но не от выбора линейной комбинации состояний двух мономеров.

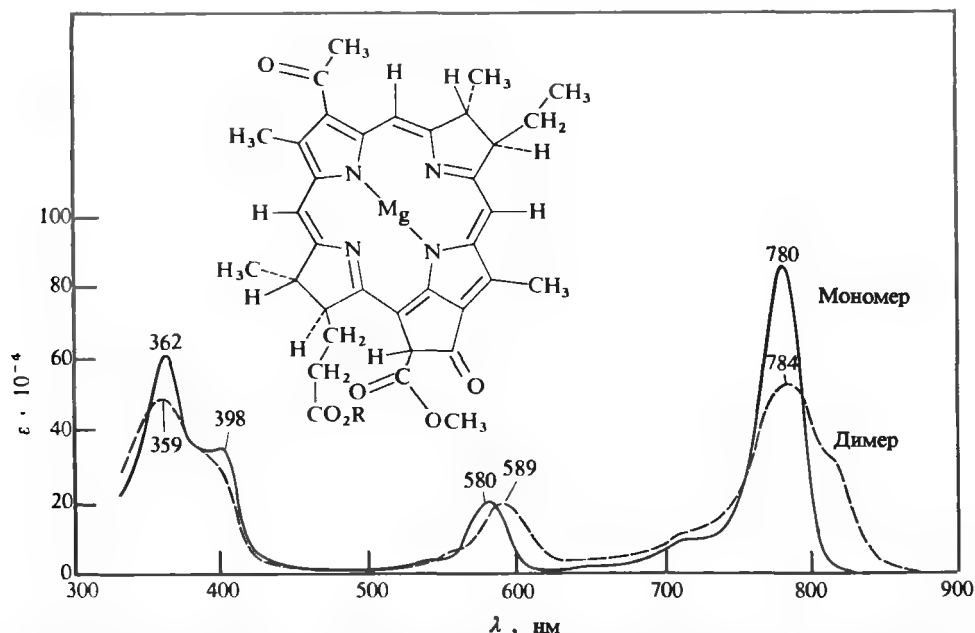


РИС. 7.19. Спектры растворов мономера и димера бактериохлорофилла. Отчетливо видно расщепление самой длинноволновой полосы димера. [K.Sauer, J.R.L.Smith, A.J.Schultz, J.Am. Chem. Soc., 88, 2681 (1966).]

ну расщепления. Это в свою очередь позволяет найти как расстояние между хромофорами (R_{12}), так и угол θ . Реальный пример такого рода представлен на рис. 7.19, где изображены спектры поглощения мономеров и димеров бактериохлорофилла. Угол между моментами переходов, порождающих наиболее длинноволновую полосу, судя по ее расщеплению для димера, составляет 82° . На практике расщепление (V_{12}) часто оказывается гораздо меньше, чем ширина полос. Это приводит к кажущемуся смещению полосы, в то время как на самом деле происходит расщепление.

ЧИСЛО ПОЛОС ПОГЛОЩЕНИЯ И ЧИСЛО ХРОМОФОРОВ

Что происходит при возбуждении более сложных молекул? Рассмотрим случай олигомеров, состоящих из одинаковых мономерных хромофоров. Можно ожидать, что тример будет обладать тремя полосами поглощения, тетрамер — четырьмя и т.д. При дальнейшем увеличении числа мономеров мы получим полимер, спектр которого может быть очень сложным. Нередко так и происходит, но, к счастью, бывают и более простые ситуации. Из рис. 7.18 видно, что уже для димера имеется несколько конфигураций, при которых наблюдается лишь одна полоса. Интенсивность другой равна нулю или крайне мала.

По мере удлинения полимерной цепи мы все с большим основанием можем пренебрегать концевыми эффектами, и, например, для регулярной спирали фактически почти все полосы поглощения будут иметь нулевую интенсивность. В случае α -спирального полипептида остаются только два отчетливо разрешенных перехода. Один обладает собственным моментом перехода, направленным параллельно оси спирали, у другого (в действительности это два перехода с одинаковой энергией) момент перехода перпендикулярен

этой оси. Расстояние между двумя полосами, как это видно из рис. 7.5, где изображен спектр α -спиральной поли-L-глутаминовой кислоты, достаточно велико. У пептидной полосы с $\lambda_{\text{max}} = 190$ нм имеется небольшое плечо при 208 нм. Результаты измерения спектров поглощения поляризованного света ориентированными образцами показывают, что при 208 нм преимущественно поглощается свет, поляризованный параллельно оси спирали. Следовательно, это $\pi \rightarrow \pi^*$ -переход, который в полимере обладает результирующим моментом, параллельным оси спирали. Переход с перпендикулярной ориентацией наблюдается при меньших длинах волн (рис. 7.5). Другой пример расщепления в спектрах полимеров показан на рис. 7.9, где сравниваются спектры поли-L-лизина в α -спиральной конформации, в конформации β -слоя и в форме беспорядочного клубка. У α -спирального образца плечо наблюдается при 205 нм. Максимум поглощения смещен в сторону меньших длин волн по сравнению с таковым для беспорядочного клубка. Заметим, что ни для беспорядочного клубка, ни для β -слоя никаких признаков расщепления не наблюдается.

Электростатическое взаимодействие рассматриваемого типа может иметь место не только между идентичными хромофорами. Качественно те же эффекты наблюдаются и в том случае, когда в непосредственной близости друг от друга оказываются разные хромофоры, обладающие достаточно близкими энергиями переходов. При этом, однако усложняется математический анализ (Tinoco, 1972). В нуклеиновых кислотах экситонно-оптические эффекты очень сложны. Приходится учитывать множество взаимодействий между соседними основаниями, принадлежащими как одной, так и разным цепям двойной спирали. Из-за сильного усреднения полосы поглощения ДНК в ближней УФ-области не обнаруживают ни сколько-нибудь заметного сдвига, ни расщепления. Однако, как мы увидим позже, при измерениях оптической активности экситонные эффекты становятся гораздо заметнее.

ГИПОХРОМИЗМ АГРЕГАТОВ ХРОМОФОРОВ

Характерной чертой экситонных эффектов является неизменность полной интегральной интенсивности спектра. Однако если внимательно изучить спектры поли-L-лизина в различных конформациях (рис. 7.9), то нетрудно заметить, что суммарная интенсивность поглощения α -спирали меньше, чем клубка. Это есть проявление другого оптического эффекта — гипохромизма (что в переводе означает «меньше цвета»). Этот эффект отчетливо проявляется в случае ДНК (рис. 7.14), которая, находясь в форме двойной спирали, поглощает примерно на 30% меньше, чем смесь составляющих ее мономеров. Можно было бы предположить, что экситонное расщепление здесь очень велико и одна из полос не регистрируется. Однако по оценкам в ДНК экситонное расщепление должно быть очень небольшим. Для спектров ДНК фактически не наблюдается ни спектрального смещения, ни уширения полос по сравнению со спектрами мономеров. Экситонные эффекты хотя и имеют место, но не вызывают значительных изменений в спектре поглощения.

Еще легче отвергнуть другое простое объяснение. Речь идет об «эффекте экранирования». Рассмотрим полимер, содержащий столь сильно поглощающие хромофоры, что весь падающий свет поглощается на поверхности молекулы. Оптическая плотность раствора такого полимера будет меньше, чем рассчитанная исходя из суммарной концентрации хромофоров, поскольку хромофоры, находящиеся внутри молекулы, не могут принять участия в поглощении. Однако, применяя закон Бэра и используя типичную величину экстинкции хромофора 10^4 , легко показать, что большинство макромолекул слишком мало, чтобы имело место заметное экранирование. Удовлетворительное объяснение гипохромизма, являющееся в настоящее время общепризнанным, было дано в конце 50-х го-

дов в работах И. Тиноко и У. Роудса (I. Tinoco, W. Rhodes) и оказалось далеко не простым.

Рассматривая экситонные эффекты в предыдущем разделе, мы учитывали только низшие по энергии возбужденные состояния каждого из хромофоров. Пока хромофоры достаточно удалены друг от друга, интенсивность их поглощения одинакова. Однако в упорядоченной структуре хромофоры взаимодействуют друг с другом, и, хотя число полос в точности равно числу хромофоров, их интенсивности уже могут различаться. В этом случае говорят, что одни полосы заимствуют интенсивность у других. Кроме того, взаимодействие между хромофорами приводит к изменению энергии возбужденных состояний.

Гипохромизм обладает определенным сходством с экситонным эффектом, однако между ними имеются и существенные различия. Гипохромизм обусловлен взаимодействием между определенным электронным переходом данного хромофора и отличными от него электронными переходами соседних хромофоров. Для простоты будем считать, что данный хромофор переходит в первое возбужденное электронное состояние, а соседние — в более высокие. Пусть система освещается светом частоты ν_{0a} , которая отвечает переходу хромофора в первое возбужденное состояние. В этом хромофоре под действием света индуцируется дипольный момент $\underline{\mu}_{0a}$, величина которого определяет интенсивность поглощения.

Какого рода воздействие испытывает данный хромофор со стороны своих соседей, или, говоря на языке квантовой механики, как изменяется при наличии такого взаимодействия волновая функция? Чтобы ответить на этот вопрос, поступим точно так же, как мы это делали для экситонных эффектов: рассмотрим взаимодействие между моментами переходов хромофора и его соседей. В случае одинаковых переходов ($0 \rightarrow a$) для двух или более хромофоров мы получаем экситонный эффект, который не сопровождается изменением суммарной интенсивности в окрестности частоты ν_{0a} . Однако при наличии взаимодействия между переходом $0 \rightarrow a$ одного хромофора со всеми более высокоэнергетическими переходами ($0 \rightarrow b$, $0 \rightarrow c$ и т.д.) его соседей суммарная интенсивность в окрестности перехода $0 \rightarrow a$ может измениться.

Точные квантовомеханические выражения для этого случая весьма сложны, и проще попытаться найти их классические аналоги. Даже если соседние хромофоры не поглощают свет частоты ν , они все же испытывают воздействие со стороны осциллирующего электромагнитного поля световой волны. Поскольку поляризуемость молекул не равна нулю, в присутствии этого поля индуцируется диполь

$$\underline{\mu}_{\text{инд}} = \underline{\alpha}(\nu) \cdot \underline{E}(\nu) \quad (7.57)$$

Здесь $\underline{\alpha}$ — тензор электрической поляризуемости молекулы при частоте ν , $\underline{E}$ — вектор напряженности электрического поля световой волны. Такие индуцированные диполи не поглощают световую энергию, а просто переизлучают ее. Это явление, относящееся к категории упругого рассеяния, ответственно за преломление света прозрачными материалами. Связь между таким классическим описанием и описанием квантовомеханическим состоит в том, что $\underline{\alpha}$ зависит от моментов переходов во все возбужденные состояния хромофора ¹⁾:

$$\underline{\alpha}(\nu) = (2/h) \sum_{i=b,c,\dots} [(\nu_{0i} \langle \Psi_0 | \underline{\mu}_i | \Psi_i \rangle \langle \Psi_i | \underline{\mu}_0 | \Psi_0 \rangle) / (\nu_{0i}^2 - \nu^2)] \quad (7.58)$$

¹⁾ Произведение $\langle \Psi_0 | \underline{\mu}_i | \Psi_i \rangle \langle \Psi_i | \underline{\mu}_0 | \Psi_0 \rangle$ в уравнении (7.58) — это тензорное произведение. Его можно представить в виде матрицы, элемент i, j , которой имеет вид $\hat{i} \cdot \langle \Psi_0 | \underline{\mu}_i | \Psi_i \rangle \langle \Psi_j | \underline{\mu}_0 | \Psi_0 \rangle \cdot \hat{j} = \langle \Psi_0 | \underline{\mu}_{ix} | \Psi_i \rangle \langle \Psi_j | \underline{\mu}_{jx} | \Psi_0 \rangle$

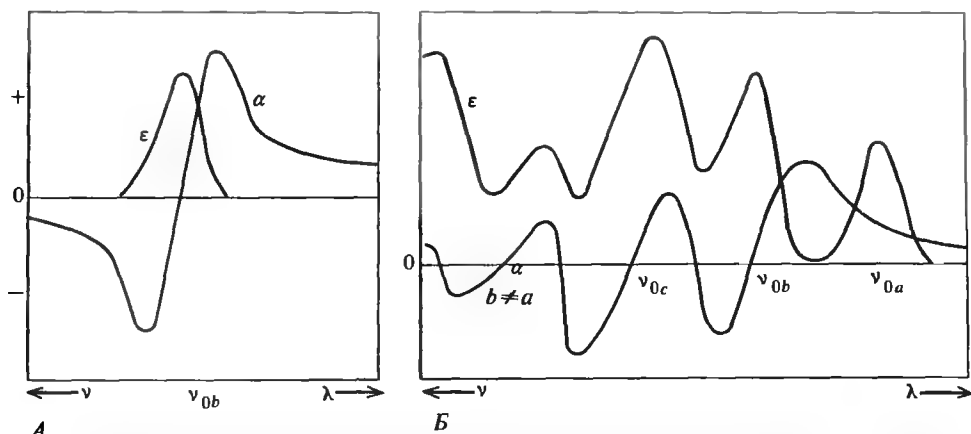


РИС. 7.20. Соотношение между коэффициентом экстинкции и поляризуемостью. А. Поляризуемость при наличии одной полосы поглощения. Б. Поляризуемость как функция частоты для молекулы, обладающей несколькими полосами поглощения. Характерные вклады поляризуемости проявляются во всех полосах, кроме наиболее длинноволновой при частоте ν_{0a} . Заметим, что здесь поляризуемость всегда положительна.

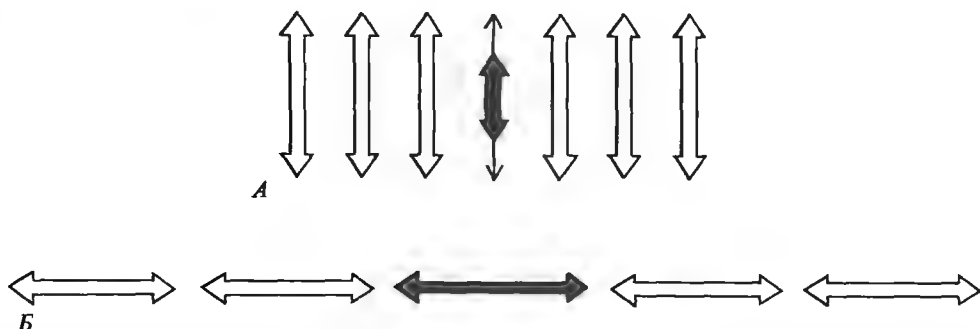


РИС. 7.21. Схематическое изображение механизма возникновения гипохромизма и гиперхромизма. А. Взаимное расположение индуцированных диполей (незакрашенные стрелки) и момента перехода (черная стрелка), при котором наблюдается гипохромизм (закрашенная стрелка). Б. Расположение индуцированных диполей и момента перехода, при котором наблюдается гиперхромизм.

В зависимости от частоты индуцированный дипольный момент $\mu_{\text{инд}}$ может быть либо в фазе, либо в противофазе с полем E , т.е. величина α может быть положительной или отрицательной (рис. 7.20). Из уравнения (7.58) следует, что каждая полоса поглощения $0 \rightarrow i$ вносит в поляризуемость вклад двоякого рода: положительный при $\nu < \nu_{0i}$ и отрицательный при $\nu > \nu_{0i}$. В частном случае, когда ν лежит вблизи низкочастотной границы спектра поглощения, $\mu_{\text{инд}}$ будет всегда в фазе. Поскольку все полосы поглощения лежат в области частот, больших чем ν_{0a} , любая из них будет вносить положительный вклад в поляризуемость при $\nu = \nu_{0a}$. Заметим, что при анализе гипохромизма нам не нужно рас-

смагивать вклад в поляризуемость от $\langle \Psi_0 | \mu | \Psi_a \rangle$. Этот вклад оказывается уже учтенным при рассмотрении экситонных эффектов, а, как было показано ранее, взаимодействие моментов переходов в одинаковые состояния двух хромофоров не может вызвать гипохромизма.

Момент перехода поглощающего хромофора будет взаимодействовать с индуцированными диполями ($\mu_{\text{инд}}$) соседних хромофоров. Результат этого взаимодействия для двух молекулярных структур схематически изображен на рис. 7.21. В параллельной стопке (рис. 7.21, А) будет происходить взаимное отталкивание диполей. Это уменьшает момент перехода поглощающего хромофора и приводит к уменьшению поглощения, т.е. к гипохромизму. При продольном расположении диполей (рис. 7.21, Б) будет наблюдаться противоположный эффект.

Эти результаты имеют весьма общий характер для ароматических хромофоров, поскольку компоненты их тензора поляризуемости, лежащие в плоскости хромофора, достаточно велики, а моменты переходов также лежат в этой плоскости. Однако следует помнить, что эти выводы справедливы только при рассмотрении наименьшего по энергии электронного перехода. Основной принцип спектроскопии, правило сумм Куна — Томаса, гласит, что полная интегральная интенсивность всех переходов должна оставаться постоянной и не изменяться при взаимодействии между состояниями. Следовательно, если переход на нижний возбужденный уровень становится менее интенсивным, какой-то более высокоэнергетический переход должен стать более интенсивным, и наоборот. Однако для данной полосы поглощения в случае упорядоченных макромолекул часто наблюдается гипохромный эффект порядка 10-50%.

Степень гипохромизма обратно пропорциональна кубу расстояния между взаимодействующими хромофорами (см. Дополнение 7.3). Это значит, что гипохромизм наблюда-

Дополнение 7.3.

ТЕОРИЯ ГИПОХРОМИЗМА

Обсуждение гипохромизма в основном тексте носит качественный характер и не может удовлетворить читателя, который привык, чтобы физические явления были описаны с помощью математических выражений. Мы рассмотрим здесь в упрощенном виде (см. Bush, 1974) применение теории Тинноко для вычисления гипохромизма димера. Волновые функции, которые использовались нами ранее, представляют собой линейные комбинации *невозмущенных* волновых функций для мономера, в то время как для описания гипохромизма необходимо использовать более точные волновые функции. Для этого нужно учесть вклад в волновую функцию каждого состояния волновых функций других состояний, обладающих большей энергией возбуждения. Коэффициенты, учитывающие величины таких вкладов, определяют при помощи теории возмущений.

Для нахождения волновой функции основного состояния будем учитывать однократно и двукратно возбужденные состояния. В первом порядке теории возмущений имеем

$$\Psi_0^1 = \phi_{10}\phi_{20} + \sum_b \sum_{b'} \phi_{1b}\phi_{2b'} V_{1b,2b'}/(E_{b'} + E_b - 2E_0)$$

Для первого возбужденного состояния учтем только однократно возбужденные конфигурации. В первом порядке теории возмущений волновые функции для двух возбужденных состояний димера имеют следующий вид:

$$\Psi_{A^+}^1 = (1/\sqrt{2})(\phi_{1a}\phi_{20} \pm \phi_{10}\phi_{2a}) + \sum_b \phi_{10}\phi_{2b} [V_{1a,2b}/(E_b - E_a)] + \sum_{b'} \phi_{1b'}\phi_{20} [V_{1b',2a}/(E_{b'} - E_a)]$$

Матричные элементы энергии взаимодействия $V_{1c,2d}$ имеют вид $\langle \phi_{10}\phi_{2d} | \underline{V} | \phi_{1c}\phi_{20} \rangle$, где $\underline{V}$ описывает электростатическое взаимодействие между двумя мономерами и обычно представляет собой

диполь-дипольный член [уравнение (7.45)]. Следовательно, эти элементы отвечают энергиям взаимодействия между моментами переходов $0 \rightarrow c$ в мономере 1 и $0 \rightarrow d$ в мономере 2.

Для вычисления дипольной силы переходов для димера используются возмущенные волновые функции

$$D_{0A^+} = |\langle \Psi_0^1 | \mu | \Psi_{A^+}^1 \rangle|^2$$

$$D_{0A^-} = |\langle \Psi_0^1 | \mu | \Psi_{A^-}^1 \rangle|^2$$

точно так же, как это делалось выше. Дипольная сила для димера вычисляется как сумма этих двух величин:

$$\begin{aligned} D_{0A} &= D_{0A^+} + D_{0A^-} = \\ &= 2D_{0a} + \sum_b [4E_b/(E_b^2 - E_a^2)] (\langle \phi_{20} | \mu_2 | \phi_{2b} \rangle \cdot \langle \phi_{10} | \mu_1 | \phi_{1a} \rangle V_{1a,2b} + \\ &\quad + \langle \phi_{10} | \mu_1 | \phi_{1b} \rangle \cdot \langle \phi_{20} | \mu_2 | \phi_{2a} \rangle V_{1b,2a}) \end{aligned}$$

D_{0A} зависит от R_{12}^3 , поскольку эта величина входит в выражения для $V_{1a,2b}$ и $V_{1b,2a}$.

Для количественного описания гипохромизма необходимо вычислить силы осцилляторов [уравнение (7.41)]. Гипохромизм в процентах ($\bar{h}$) выражается следующим образом:

$$\bar{h} = (1 - f_{0A}/f_{0a})100$$

где f_{0A} — сила осциллятора для димера или полимера в расчете на *один остаток*, f_{0a} — сила осциллятора для мономера. Иногда оказывается удобным ввести гипохромизм в процентах при определенной длине волны (H). По аналогии с предыдущим

$$H(\lambda) = [1 - \epsilon_n(\lambda)/\epsilon_m(\lambda)]100$$

где ϵ_n — коэффициент экстинкции полимера в расчете на один остаток, а ϵ_m — коэффициент экстинкции мономера.

ется только при достаточно плотной упаковке и эффект исходит в основном от ближайших соседей. На гипохромизм влияет и взаимное расположение хромофоров. Рассмотрим стопку из двух плоских хромофоров. Изменение угла между плоскостями приводит к заметному эффекту, в то время как поворот одного из хромофоров в плоскости, параллельной плоскости другого, сопровождается гораздо меньшим изменением гипохромизма. Это связано с тем, что поляризуемость плоских хромофоров обычно в значительной степени изотропна по отношению к повороту в плоскости хромофоров.

На практике гипохромный эффект редко используется для анализа структурных деталей. Он служит лишь четким указателем на то, каким образом — в виде стопки или цепочки — упакованы хромофоры. Кроме того, гипохромизм обычно применяется в качестве простого количественного показателя при образовании и разрушении упорядоченной структуры под действием тех или иных факторов. В последующих главах в связи с обсуждением конформационных изменений в нуклеиновых кислотах будет приведено много примеров такого рода.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОРИЕНТАЦИИ ХРОМОФОРА ПРИ ПОМОЩИ ЛИНЕЙНОГО ДИХРОИЗМА

До сих пор при обсуждении спектров белков и нуклеиновых кислот мы считали, что эти спектры регистрируются в неполяризованном свете при беспорядочной ориентации мо-

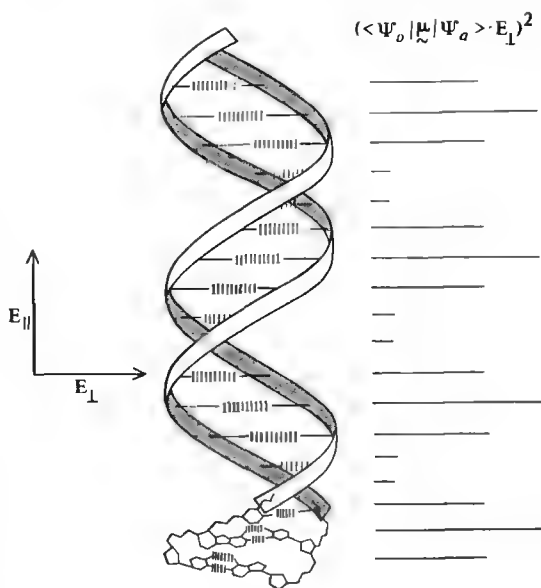


РИС. 7.22. Линейный дихроизм, ожидаемый для В-формы двойной спирали ДНК, расположенной относительно падающего поляризованного света так, как это изображено на рисунке. Поскольку момент перехода $\langle \Psi_0 | \mu | \Psi_a \rangle$ лежит в плоскости пар оснований, он всегда направлен перпендикулярно $E_{\parallel}$. Интенсивность поглощения периодически меняется вдоль спирали, так как угол между $\langle \Psi_0 | \mu | \Psi_a \rangle$ и E изменяется на 36° при переходе к каждой последующей паре оснований. (Структура ДНК дана по A.Kornberg, DNA Synthesis, San Francisco, W.H.Freeman and Company, 1974.)

лекул в растворе. Следовательно, измеряемая таким образом интенсивность поглощения $|\langle \Psi_0 | \mu | \Psi_a \rangle \cdot E|^2$ в действительности является величиной, усредненной по всем ориентациям; она пропорциональна $|\langle \Psi_0 | \mu | \Psi_a \rangle|^2 |E|^2$. При использовании поляризованного света и ориентированных образцов становится возможным измерять линейный дихроизм, как это было описано ранее. Здесь мы рассмотрим несколько примеров, имеющих практическое значение.

Предположим, что мы имеем ориентированный образец ДНК, в котором оси двойных спиралей параллельны (рис. 7.22.). Исходя из наших представлений о спектроскопических свойствах ДНК мы можем сказать, что вероятность поглощения света, поляризованного параллельно и перпендикулярно оси спирали, будет существенно разной. Напомним, что наиболее интенсивный в случае оснований нуклеиновых кислот $\pi \rightarrow \pi^*$ -переход с $\lambda_{\max} = 260$ нм поляризован в плоскости оснований. Это означает, что момент перехода $\langle \Psi_0 | \mu | \Psi_a \rangle$ перпендикулярен $E_{\parallel}$. Таким образом, составляющая с поляризацией, параллельной оси спирали, будет поглощаться лишь в очень незначительной степени. Напротив, составляющая $E_{\perp}$ параллельна $\langle \Psi_0 | \mu | \Psi_a \rangle$, и здесь будет наблюдаться заметное поглощение. В результате дихроичное отношение $d = (A_{\parallel} - A_{\perp}) / (A_{\parallel} + A_{\perp})$ будет меньше нуля. Наблюдаемый отрицательный дихроизм ДНК служит сильным доводом в пользу того, что в растворе двухцепочечная ДНК близка по своей структуре к В-форме, в которой пары оснований лежат в одной плоскости, перпендикулярной продольной оси молекулы.

Другой пример — линейный дихроизм в двух экситонно расщепленных $\pi \rightarrow \pi^*$ -полосах α -спирали поли-L-глутаминовой кислоты (рис. 7.5). Переходы в пептидных группах поляризованы под углом к оси спирали. Экситонное взаимодействие между этими группами приводит к появлению в спектре лишь двух интенсивных полос: одна из них поляризована перпендикулярно оси спирали, другая — параллельно. Таким образом, в ориентированных образцах каждая из полос обнаруживает сильный линейный дихроизм, причем знак дихроизма для этих полос оказывается противоположным: для параллельно поляризованной составляющей дихроизм положителен, для перпендикулярно поляризованной — отрицателен.

Краткие выводы

Основные принципы спектроскопии в области электронных переходов молекул вытекают из квантовомеханического рассмотрения. Те же принципы без существенных изменений применимы ко всем видам спектроскопии. Наиболее информативными параметрами спектров являются длина волны перехода, которая отражает разность энергий участвующих в переходе состояний, и интенсивность, которая пропорциональна квадрату индуцированного светом дипольного момента (момента перехода).

Поглощение белков в дальней УФ-области определяется пептидными хромофорами, а в ближней — главным образом боковыми группами ароматических аминокислот. В нуклеиновых кислотах основной вклад в поглощение вносят основания.

Спектр поглощения полимера отличается от суммы спектров составляющих его мономеров по нескольким причинам. Под влиянием окружения изменяется относительная энергия основного и возбужденного состояний, и такие изменения вызывают спектральные смещения. Электронные взаимодействия между хромофорами приводят к двум явлениям: экситонному расщеплению и гипохромизму. Экситонное расщепление обусловлено взаимодействием одинаковых или близких возбужденных состояний мономеров. В молекуле, содержащей два хромофора, оно ведет к удвоению числа полос поглощения. Распределение интенсивности в каждой паре димерных полос зависит от угла между двумя хромофорами. Энергия, разделяющая пару экситонных полос, также зависит от ориентации; кроме того, она обратно пропорциональна кубу расстояния между хромофорами. В полимере, содержащем n звеньев, экситонные эффекты, вообще говоря, приводят к расщеплению полосы на n полос, но лишь некоторые из них обладают ненулевой интенсивностью.

Гипохромизм обусловлен взаимодействием данного электронного перехода одного хромофора с иными электронными переходами других хромофоров. Когда хромофоры уложены в стопку, интенсивность наиболее длинноволновой полосы поглощения всегда уменьшается.

В ориентированных полимерах интенсивность поглощения плоскополяризованного света зависит от угла между направлением поляризации и направлением момента перехода. Этот эффект, называемый линейным дихроизмом, при благоприятном стечении обстоятельств может быть использован для выяснения взаимной ориентации хромофоров в полимере.

Задачи

7.1. Рассмотрим тример из трех одинаковых хромофоров. Предположим, что мономеры ориентированы относительно друг друга так, что $V_{12} = V_{23} = V$, а $V_{13} = 0$, где V_{12} определяется из уравнения (7.51), а V_{13} и V_{23} получаются аналогичным образом при замене индексов 1 или 2 на 2 или 3 соответственно. Волновые функции такого тримера, записанные в виде линейных комбинаций волновых функций основного и возбужденного состояний мономера, имеют следующий вид.

$$\text{Основное состояние: } \Psi_0 = \phi_1\phi_2\phi_3$$

$$\text{Возбужденное состояние: } \Psi_{A^0} = (1/\sqrt{2})(\phi_{1a}\phi_{20}\phi_{30} - \phi_{10}\phi_{20}\phi_{3a})$$

$$\Psi_{A^+} = (1/2)(\phi_{1a}\phi_{20}\phi_{30} + \sqrt{2}\phi_{10}\phi_{2a}\phi_{30} + \phi_{10}\phi_{20}\phi_{3a})$$

$$\Psi_{A^-} = (1/2)(-\phi_{1a}\phi_{20}\phi_{30} + \sqrt{2}\phi_{10}\phi_{2a}\phi_{30} - \phi_{10}\phi_{20}\phi_{3a})$$

Покажите, что

- а. Эти волновые функции ортогональны и нормированы.
- б. Они являются собственными функциями гамильтониана

$$\underline{H} = \underline{H}_1 + \underline{H}_2 + \underline{H}_3 + \underline{V}_{12} + \underline{V}_{23} + \underline{V}_{13}$$

Вычислите энергии состояний.

- в. Частоты спектральных переходов тримера равны

$$\nu_{0 \rightarrow A^0} = \nu_{0a}$$

$$\nu_{0 \rightarrow A^\pm} = \nu_{0a} \pm \sqrt{2} V/h$$

- г. Все три волновые функции для возбужденных состояний описывают стационарные состояния гамильтониана из п. б).

- д. Дипольные силы трех полос поглощения тримера равны

$$D_{0A^0} = D_{0a}(1 - \cos \theta_{13})$$

$$D_{0A^+} = D_{0a}[1 + (\sqrt{2}/2)(\cos \theta_{12} + \cos \theta_{23}) + (1/2) \cos \theta_{13}]$$

$$D_{0A^-} = D_{0a}[1 - (\sqrt{2}/2)(\cos \theta_{12} + \cos \theta_{23}) + (1/2) \cos \theta_{13}]$$

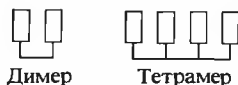
где θ_{ij} — угол между моментами переходов i -го и j -го мономеров, а D_{0a} — дипольная сила для мономера.

- е. Экситонные эффекты не приводят к гипохромизму в рассматриваемом тримере.
- ж. Если $V_{13} \neq 0$, то три волновые функции для возбужденных состояний больше не описывают стационарные состояния гамильтониана.

7.2. Рассмотрим димер в виде стопки из двух мономеров, у которых моменты переходов образуют угол 60° . Найдите линейный дихроизм, ожидаемый для переходов с частотами ν_{0A^+} и ν_{0A^-} , предполагая, что составляющая $E_{\parallel}$ параллельна моменту перехода одного из мономеров, а $E_{\perp}$ перпендикулярна ему и лежит в плоскости этого мономера.

7.3. Предположим, что имеется раствор молекул, радиус каждой из которых составляет $10 \text{ \AA}$; оптическая плотность раствора при 260 нм равна 1. Коэффициент молярной экстинкции равен $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Все молекулы самопроизвольно агрегируют и образуют одну частицу сферической формы с кубической плотной упаковкой исходных молекул. Оцените оптическую плотность агрегата. Можно считать, что свет освещает всю кювету спектрометра размером $1 \times 1 \times 1 \text{ см}$.

7.4. Предположим, что имеются димер и тетрамер в виде стопок мономеров,



причем расстояния между соседними основаниями одинаковы. Пусть гипохромизм димера равен 10%. Оцените гипохромизм тетрамера, используя тот факт, что гипохромизм обратно пропорционален кубу расстояния между хромофорами.

7.5. Пусть в циклогексане некое вещество имеет полосу поглощения с $\lambda_{\max} = 280 \text{ нм}$. Предположим, что в воде влияние растворителя сводится только к образованию водородных связей между молекулами воды и растворенного вещества в возбужденном (но не в основном) состоянии. Оцените $\lambda_{\max}$ для водного раствора этого вещества, если энергия водородной связи составляет $5 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$.

ЛИТЕРАТУРА

Общая

- Birks J.B.*, 1970. *Photophysics of Aromatic Molecules*, New York, Wiley-Interscience.
- Eyring H.*, *Walter J.*, *Kimble G.E.*, 1944. *Quantum Chemistry*, New York, Wiley. [Имеется перевод: Эйринг Г., Уолтер Дж. и др. Квантовая химия.— М.: ИЛ, 1948. Старое издание, до сих пор остающееся одним из лучших пособий по спектроскопии.]
- Freifelder D.*, 1976. *Physical Biochemistry*, San Francisco, W.H. Freeman and Company. [Элементарное введение.]
- Jaffe H.H.*, *Orchin M.*, 1962. *Theory and Application of Ultraviolet Spectroscopy*, New York, Wiley.
- Kauzmann W.*, 1957. *Quantum Chemistry*, New York, Academic Press. [Имеется перевод: Козман У. Введение в квантовую химию.— М.: ИЛ, 1960. Сравнение классического и квантового описаний оптических свойств.]
- Merzbacher E.*, 1970. *Quantum Mechanics*, 2nd ed., New York, Wiley. [Хорошее изложение нестационарной теории возмущений.]

Специальная

- Bush C.A.*, 1974. Ultraviolet spectroscopy, circular dichroism and optical rotatory dispersion. In: *Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry*, ed. P.O.P. Ts'o, New York, Academic Press, p. 92.
- Donovan J.W.*, 1973. Ultraviolet difference spectroscopy: new techniques and applications. Spectrophotometric titrations of the functional groups of proteins. In: *Methods in Enzymology*, vol. 27, eds. C.H.W. Hirs and S.N. Timasheff, New York, Academic Press, p. 497; p. 525.
- Gratzer W.B.*, 1967. Ultraviolet absorption spectra of polypeptides. In: *Poly-L-amino Acids*, ed. G.D. Fasman, New York, Marcel Dekker, p. 177.
- Hofrichter J.*, *Eaton W.A.*, 1976. Linear dichroism of biological chromophores, *Ann. Rev. Biophys. Bioengin.*, 5, 511.
- Holzwarth G.*, 1972. Ultraviolet spectroscopy of biological membranes. In: *Membrane Molecular Biology*, eds. C.F. Fox and A. Keith, Stamford, Conn., Sinauer Assoc., p. 228.
- Kasha M.*, 1963. Energy transfer mechanisms and the molecular exciton model for molecular aggregates, *Radiation Res.*, 20, 55.
- Timasheff S.N.*, 1970. Some physical probes of enzyme structure in solution. In: *The Enzymes*, 3rd ed., vol. 2, ed. P.D. Boyer, New York, Academic Press, p. 371.
- Tinoco I., Jr.*, 1962. Theoretical aspects of optical activity, part two: Polymers, *Adv. Chem. Phys.*, 4, 113.
- Tinoco I., Jr.*, 1965. Absorption and rotation of polarized light by polymers. In: *Molecular Biophysics*, ed. W. Weissbluth, New York, Academic Press, p. 269.

Глава 8 Другие оптические методы

8.1. Оптическая активность

Практически все молекулы, синтезируемые живыми организмами, обладают оптической активностью. Это свойство является столь универсальным для живых систем (в том виде, в каком эти системы существуют сейчас), что его наличие или отсутствие служит одним из главных критериев в наших суждениях, например, о том, несут ли метеориты доказательства существования жизни где-либо еще во Вселенной. Оптическая активность небольших молекул сопряжена с отсутствием у них определенного элемента симметрии, в частности она наблюдается при наличии асимметричных атомов углерода и их воздействии на соседние хромофоры. Мы не будем рассматривать здесь оптическую активность такого рода, т.е. активность, связанную с конфигурацией молекул, а уделим основное внимание вопросу о влиянии на оптическую активность макромолекул их конформации. Как и в процессах поглощения света, главная роль здесь принадлежит взаимодействиям между соседними хромофорами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Имеются по меньшей мере четыре характеристики, которые можно исследовать при прохождении света через оптически активную среду: оптическое вращение, эллиптичность, круговой дихроизм и круговое двулучепреломление. Обратимся к рис. 8.1. Предположим, что наблюдатель смотрит вдоль направления распространения световой волны; предположим также, что падающий свет является плоскополяризованным (рис. 8.1, А). Тогда наблюдатель увидит, что вектор электрического поля $\mathbf{E}$ колеблется по синусоидальному закону в плоскости рисунка: $\mathbf{E} = \hat{\mathbf{i}} E_0 \sin \omega t$, где $\hat{\mathbf{i}}$ — единичный вектор в направлении оси x , $\omega = 2\pi\nu$ — круговая частота света.

После прохождения через оптически активную поглощающую среду свет претерпевает два типа изменений. Первое — вектор $\mathbf{E}$ более не лежит строго в одной плоскости, а описывает эллипс (рис. 8.1, Б). (В действительности конец этого вектора движется по эллиптической винтовой линии, но нас интересует лишь его проекция на плоскость x — y , перпендикулярную направлению распространения света.) Эллиптичность света является одной из мер оптической активности. Она определяется как арктангенс отношения малой и большой осей эллипса. Например, эллипс с отношением осей 1/100 имеет эллиптичность $0,57^\circ$.

Вторым параметром, характеризующим оптическую активность, служит ориентация эллипса. Заметим, что большая ось эллипса не параллельна направлению поляризации падающего света. Если свет практически не поглощается средой, отношение осей эллипса оказывается столь малым, что свет по сути дела остается плоскополяризованным. В этом случае можно говорить просто о повороте плоскости поляризации света. Таким образом, ориентация эллипса отвечает оптическому вращению. Величина оптического вращения зависит от длины волны, поэтому часто используется термин «дисперсия оптического вращения» (ДОВ).

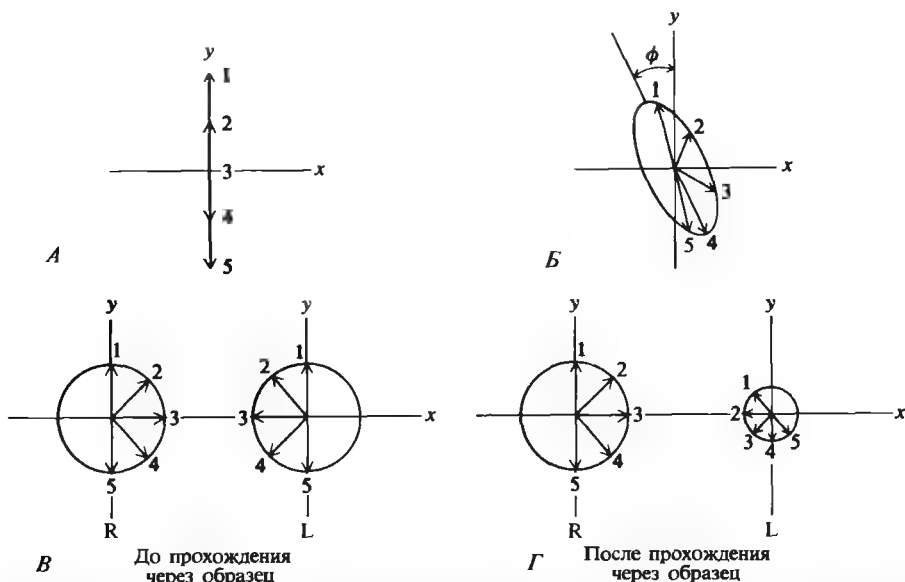


РИС. 8.1. Взаимодействие линейно поляризованного света с оптически активным поглощающим веществом. Вектор электрического поля всюду изображен так, как его видел бы наблюдатель, если бы он смотрел вдоль направления распространения световой волны. Точки 1 — 5 соответствуют последовательным равным промежуткам времени. *А*. Падающий линейно поляризованный свет. *Б*. Эллиптически поляризованный свет, выходящий из оптически активного образца. *В*. Разложение линейно поляризованного света на лево- (*L*) и правополяризованную (*R*) составляющие. *Г*. Лево- и правополяризованная составляющие после прохождения через образец. Их суммирование дает картину, изображенную на рис. *Б*.

Плоскополяризованный свет удобнее представить в виде суммы двух волн противоположной круговой поляризации и равной амплитуды:

$$\mathbf{E}_R = \frac{1}{2}(\hat{\mathbf{i}}E_0 \sin \omega t + \hat{\mathbf{j}}E_0 \cos \omega t)$$

$$\mathbf{E}_L = \frac{1}{2}(\hat{\mathbf{i}}E_0 \sin \omega t - \hat{\mathbf{j}}E_0 \cos \omega t)$$

где $\hat{\mathbf{j}}$ — единичный вектор в направлении оси y (рис. 8.1, *В*). Сложение этих составляющих в каждый данный момент времени дает просто плоскополяризованный свет. Влияние оптически активной среды на проходящий через нее свет удобно изучать, рассматривая каждую из круговых составляющих по отдельности. Оказывается, что в такой среде поглощение света, обладающего левой круговой поляризацией (A_L), отличается от поглощения правополяризованного света (A_R). После прохождения через среду каждая составляющая остается по-прежнему поляризованной по кругу, но радиусы окружностей, описываемых электрическими векторами, теперь различаются. Это явление называется круговым дихроизмом (КД). В результате сложения противоположно поляризованных составляющих получается эллиптически поляризованный свет, так как составляющие обладают разными амплитудами (рис. 8.1, *Г*). Таким образом, КД эквивалентен эллиптичности.

Рис. 8.1, *Б* демонстрирует четвертое и последнее проявление оптической активности. Если две поляризованные по кругу составляющие поглощаются при некоторой длине вол-

ны по-разному, то среда будет обладать и разными показателями преломления (n) для этих двух составляющих практически при *всех* длинах волн ¹⁾. Это означает, что одна из них будет распространяться в среде с большей скоростью, чем другая. В результате составляющие окажутся сдвинутыми относительно друг друга по фазе, причем сдвиг будет пропорционален разности $n_L - n_R$. Этот эффект называется круговым двулучепреломлением. При сложении составляющих фазовый сдвиг приводит к постоянному повороту большой оси эллипса в случае эллиптически поляризованного света. Таким образом, круговое двулучепреломление эквивалентно оптическому вращению.

Нетрудно получить точное соотношение между КД и эллиптичностью (θ) и между круговым двулучепреломлением и оптическим вращением (ϕ). Для образца толщиной l имеем

$$\phi = 180l(n_L - n_R)/\lambda \text{ град} \quad (8.1)$$

$$\theta = 2,303(A_L - A_R)180/4\pi \text{ град} \quad (8.2)$$

На практике обычно измеряют какую-либо одну из этих величин (см. Дополнение 8.1). Круговое двулучепреломление, как правило, оказывается весьма незначительным, поэтому гораздо удобнее измерять непосредственно ϕ . Для раствора типичного белка или нуклеиновой кислоты с концентрацией хромофоров 10^{-4} М поворот плоскости поляризации света составляет от 0,01 до 0,1° на 1 см толщины образца.

КД легко измерить путем попеременного пропускания через образец то лево-, то правополяризованного света и регистрации соответствующей разности поглощений. Эта разность, как правило, составляет примерно от 0,03 до 0,3 % от общего поглощения и может быть весьма точно измерена современными приборами. Эллиптичность выходящего из оптически активного образца света обычно очень мала, и ее точное измерение весьма затруднительно. Однако, несмотря на то что в действительности обычно измеряют величину $A_L - A_R$, часто пересчитывают полученные данные при помощи уравнения (8.2) с тем, чтобы получить эллиптичность. Это облегчает сопоставление результатов для ϕ и θ , поскольку эти величины измеряются в одних и тех же единицах (градусах).

Для того чтобы сравнить результаты, полученные при исследовании разных образцов, необходимо вычислить оптическую активность, приходящуюся на один моль или на одно звено. Молярная эллиптичность ($[\theta]$) и молярное вращение ($[\phi]$) связаны с измеряемыми величинами, концентрацией исследуемого вещества (C) в молях на литр и длиной оптического пути следующим образом:

$$[\phi] = 100\phi/C l \quad (8.3)$$

$$[\theta] = 100\theta/C l \quad (8.4)$$

Круговой дихроизм иногда представляют в виде $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$. Используя уравнения (8.1) и (8.4), а также закон Ламберта—Бэра, можно показать, что

$$[\theta] = 3300 \Delta\epsilon \quad (8.5)$$

Если, как это обычно делают при исследовании макромолекул, C выражается в молях мономерных звеньев, то приведенные три уравнения также определяют эллиптичность и вращение, приходящиеся на один моль звеньев. (Типичные значения этих величин указаны в Дополнении 8.1.)

¹⁾ Рис. 7.20, A иллюстрирует тот факт, что поглощение при некоторой данной частоте влияет на поляризуемость (и, значит, на показатель преломления) при всех частотах.

Дополнение 8.1

ХАРАКТЕРНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ, ПОЛУЧАЕМЫЕ ПРИ ИЗМЕРЕНИИ ОПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Оптическое вращение и круговое двулучепреломление. Пусть при прохождении поляризованного света с длиной волны 300 нм через образец толщиной 1 см происходит поворот плоскости поляризации на $0,01^\circ$. Соответствующее круговое двулучепреломление [согласно уравнению (8.1)] будет равно

$$n_L - n_R = \phi\lambda/180l = (0,01)(3 \cdot 10^{-5} \text{ см})/(180)(1 \text{ см}) = 1,67 \cdot 10^{-9}$$

Эта величина слишком мала для того, чтобы ее можно было зарегистрировать. Если концентрация исследуемого вещества равна 10^{-4} М, то молярное вращение [согласно уравнению (8.3)] составит

$$\phi = 100\phi/Cl = (100)(0,01)/(10^{-4} \text{ М})(1 \text{ см}) = 10^4 \text{ град} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$$

что представляет собой типичную величину для изолированных оптически активных хромофоров. Вращение, приходящееся на один моль мономеров полимерной спирали, обычно в десять раз больше.

Эллиптичность и круговой дихроизм. Пусть этот же образец обладает эллиптичностью $0,01^\circ$. Поскольку при малых a/b $\arctg(a/b) \approx a/b$ радиан, отношение осей эллипса (a/b) будет равно

$$a/b = (2\pi/360)\theta = (2\pi/360)(0,01) = 1,76 \cdot 10^{-4}.$$

Такой эллипс, изображенный в разумном масштабе, будет практически неотличим от отрезка прямой. Круговой дихроизм, отвечающий эллиптичности в $0,01^\circ$, в соответствии с уравнением (8.2) равен

$$A_L - A_R = 4\pi(0,01)/(2,303)(180) = 3,03 \cdot 10^{-4}.$$

Это вполне измеримая величина. Для образца концентрации 10^{-4} М молярная эллиптичность, согласно уравнению (8.4), составит

$$[\theta] = 100 \theta/Cl = 100(0,01)/(10^{-4} \text{ М})(1 \text{ см}) = 10^4 \text{ град} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$$

Это типичная величина для изолированных мономерных остатков. Для полимера эллиптичность, приходящаяся на один моль мономерных звеньев, нередко оказывается в десять раз выше. Величину $\Delta\epsilon$ легко получить как $(A_L - A_R)/Cl = [\theta]/3300 = 3,303$.

СООТНОШЕНИЕ МЕЖДУ ДОВ И КД

Мы уже свели четыре параметра, характеризующие оптическую активность, к двум: $[\phi]$ и $[\theta]$. Однако и эти две величины не являются независимыми: они связаны интегральными соотношениями, называемыми уравнениями Крамерса—Кронига. Эти интегралы выражают весьма общие закономерности ответа системы на внешнее возмущение, например свет. Преобразования Крамерса—Кронига можно записать в следующем виде:

$$[\phi(\lambda)] = \frac{2}{\pi} \int_0^\infty \frac{[\theta(\lambda')]\lambda'}{\lambda^2 - \lambda'^2} d\lambda' \quad (8.6)$$

$$[\theta(\lambda)] = -\frac{2\lambda}{\pi} \int_0^\infty \frac{[\phi(\lambda')]}{\lambda^2 - \lambda'^2} d\lambda' \quad (8.7)$$

где черточка на знаках интегралов означает, что несобственный интеграл следует понимать в смысле главного значения.

Эти уравнения в принципе позволяют найти точное значение КД (эллиптичности), если известна ДОВ при всех длинах волн, и наоборот. На самом деле, даже если имеющиеся данные простираются лишь на ограниченный интервал длин волн, эти интегралы являются хорошим приближением преобразований Крамерса — Кронига. Такие данные обычно оказываются не менее точными, чем экспериментальные. Следовательно, информация, получаемая при измерениях $[\phi]$ и $[\theta]$, является избыточной. В большинстве случаев достаточно измерить какую-нибудь одну из этих величин. По причинам, о которых речь пойдет ниже, предпочтение обычно отдают измерениям КД.

ДОВ и КД образца сильно зависят от длины волны падающего света. В случае поглощающих образцов ДОВ и КД определяют, как правило, в том же интервале длин волн, что и поглощение. Получающиеся спектры оптической активности называют спектрами ДОВ и КД. Если молекулы образца обладают только разрешенными электронными переходами (такими, как $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходы), форма спектра КД (часто называемого эффектом Коттона) связана с формой полосы поглощения весьма простым образом (рис. 8.2.). Вне полосы поглощения $[\theta] = 0$. Это очевидно, поскольку $[\theta] \propto A_L - A_R$, а как A_L , так и A_R равны нулю. В тех спектральных областях, где образец поглощает свет, форма полос

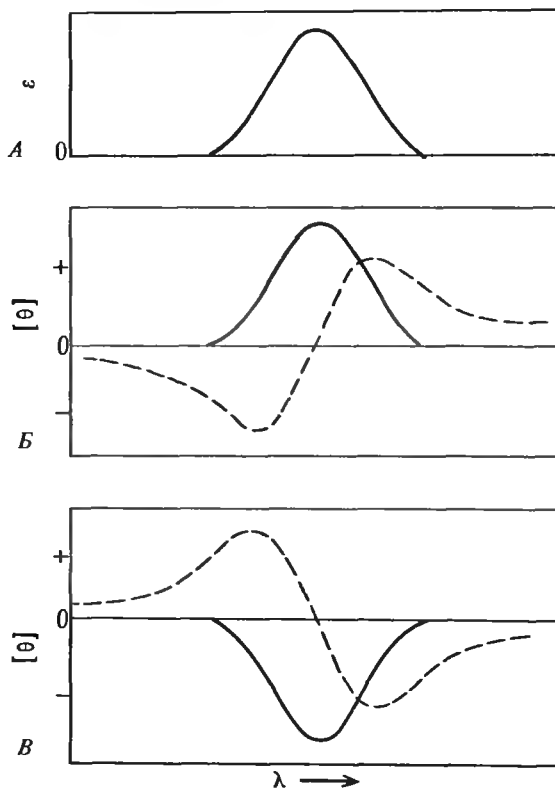


РИС. 8.2. Схематическое изображение спектров, соответствующих разрешенным переходам. А. Спектр поглощения. Б. Спектры КД (сплошная кривая) и ДОВ (штриховая кривая) в случае положительного эффекта Коттона. В. Спектры КД и ДОВ в случае отрицательного эффекта Коттона.

спектров КД и поглощения совпадает, но $[\theta]$ может быть как положительной величиной, так и отрицательной. Знак и интегральная интенсивность полос КД сильно зависят от структуры молекулы. Таким образом, из спектра КД можно извлечь два дополнительных параметра для каждого из электронных переходов макромолекулы.

Спектры ДОВ на рис. 8.2. выглядят на первый взгляд как производные спектров КД. Имеется точка, где оптическое вращение равно нулю; она совпадает с минимумом или максимумом спектра КД. Однако спектры ДОВ вне полосы поглощения спадают довольно медленно. Здесь они хорошо описываются уравнением Друде

$$[\phi(\lambda)] = A_0/(\lambda^2 - \lambda_0^2) \quad (8.8)$$

где A_0 — постоянная, характеризующая интенсивность соответствующего спектра КД, а λ_0 — длина волны, при которой ДОВ обращается в нуль. Из уравнения Друде ясно, почему некоторые вещества — такие, как сахароза, — обладают заметным оптическим вращением в видимой области, даже если они не поглощают видимый свет.

На первых этапах исследований оптической активности белков и нуклеиновых кислот приборов для регистрации КД не было, а ДОВ можно было измерять только вдали от полос поглощения. Поэтому экспериментальные данные обрабатывались при помощи уравнения Друде путем подгонки параметров A_0 и λ_0 , на основании которых судили о структуре и конформации исследуемых макромолекул. В некоторых случаях приходилось брать несколько слагаемых вида (8.8). Хотя в свое время такой подход был очень популярен, теперь он вытеснен другими методами, которые будут описаны ниже. Эти методы применимы во всем диапазоне длин волн, где в настоящее время проводятся экспериментальные исследования.

ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЯВЛЕНИЯ

Предположим, что спектр поглощения молекулы известен. Поскольку полосы КД и поглощения обычно имеют одинаковую форму, спектр КД можно найти из спектра поглощения при условии, что нам известны площадь каждой полосы КД и ее знак. Эти две величины дают силу вращения (R_{0a}) перехода $0 \rightarrow a$. Сила вращения вводится аналогично силе диполя, которая есть мера интенсивности поглощения (гл. 7):

$$R_{0a} = (3hc/8\pi^3 N_0) \int \{[\theta(\lambda)]/\lambda\} d\lambda \quad (8.9)$$

где h — постоянная Планка, c — скорость света, а интеграл берется в пределах, ограничивающих область, где проявляется КД только от перехода из состояния 0 в состояние a .

Л. Розенфельд в 1928 г. показал, как, исходя из принципов квантовой механики, найти силу вращения, зная волновые функции основного (Ψ_0) и возбужденного (Ψ_a) состояний асимметричной молекулы:

$$R_{0a} = \text{Im} (\langle \Psi_0 | \underline{\mu} | \Psi_a \rangle \cdot \langle \Psi_a | \underline{m} | \Psi_0 \rangle) \quad (8.10)$$

где $\underline{\mu}$ — оператор электрического дипольного момента, $\underline{m}$ — оператор магнитного дипольного момента, а Im означает, что берется лишь мнимая часть выражения. Для электрона $\underline{m}$ можно записать в виде

$$\underline{m} = (e/2mc)(\underline{r} \times \underline{p}) \quad (8.11)$$

где e и m — соответственно заряд и масса электрона, $\underline{p}$ — оператор импульса, $\underline{r}$ — оператор пространственных координат электрона. Член $\underline{r} \times \underline{p}$ представляет собой просто орбитальный момент количества движения электрона, так что оператор магнит-



РИС. 8.3. Схематическое изображение перемещений заряда, происходящих в молекуле под действием света. *А.* Поглощение за счет взаимодействия молекулы с электрической компонентой световой волны. *Б.* Поглощение за счет взаимодействия с магнитной компонентой световой волны. *В.* Оптическая активность.

ного дипольного момента в действительности отвечает круговому вращению заряда (см. Дополнение 8.2, где рассмотрены свойства векторного произведения). Для уяснения физического смысла магнитному моменту перехода можно поставить в соответствие возникающий под действием света замкнутый ток, а электрическому — осциллирующий под действием света диполь (рис. 8.3). Оператор импульса $\hat{\mathbf{p}} = (\hbar/i) \nabla$. Поскольку он является чисто мнимым оператором, магнитный момент перехода также является мнимой величиной. Однако R_{0a} представляет собой мнимую часть произведения действительного и мнимого чисел. Следовательно, R_{0a} — действительное число, как и должно быть, так как оно соответствует наблюдаемой физической величине.

Дополнение 8.2

ПРОИЗВЕДЕНИЯ ВЕКТОРОВ

В этой книге нам встретятся четыре вида произведений векторов: скалярное, векторное, смешанное и тензорное. Для векторов $\mathbf{A} = \hat{\mathbf{i}}A_x + \hat{\mathbf{j}}A_y + \hat{\mathbf{k}}A_z$ и $\mathbf{B} = \hat{\mathbf{i}}B_x + \hat{\mathbf{j}}B_y + \hat{\mathbf{k}}B_z$ они определяются следующим образом.

Скалярное произведение:

$$\mathbf{A} \cdot \mathbf{B} = A_x B_x + A_y B_y + A_z B_z$$

Скалярное произведение представляет собой скаляр, причем $\mathbf{A} \cdot \mathbf{B} = \mathbf{B} \cdot \mathbf{A}$. Скалярное произведение вектора на самого себя есть квадрат длины этого вектора. В матричном представлении

$$\mathbf{A} \cdot \mathbf{B} = (A_x A_y A_z) \begin{pmatrix} B_x \\ B_y \\ B_z \end{pmatrix}$$

Векторное произведение:

$$\mathbf{A} \times \mathbf{B} = \hat{\mathbf{i}}(A_y B_z - A_z B_y) + \hat{\mathbf{j}}(A_z B_x - A_x B_z) + \hat{\mathbf{k}}(A_x B_y - A_y B_x)$$

Наиболее удобной для запоминания является детерминантная форма записи:

$$\mathbf{A} \times \mathbf{B} = \begin{vmatrix} \hat{\mathbf{i}} & \hat{\mathbf{j}} & \hat{\mathbf{k}} \\ A_x & A_y & A_z \\ B_x & B_y & B_z \end{vmatrix}$$

При этом становится очевидным, что $\mathbf{A} \times \mathbf{B} = -\mathbf{B} \times \mathbf{A}$. Векторное произведение двух векторов представляет собой третий вектор, перпендикулярный плоскости, образованной двумя первыми векторами.

Смешанное произведение: $\mathbf{A} \cdot \mathbf{B} \times \mathbf{C}$. Точный вид соответствующего соотношения можно получить, пользуясь выражениями для скалярного и векторного произведений. Это произведение представляет собой скаляр, и для него справедливы следующие соотношения:

$$\mathbf{A} \cdot \mathbf{B} \times \mathbf{C} = -\mathbf{A} \cdot \mathbf{C} \times \mathbf{B} = \mathbf{C} \cdot \mathbf{A} \times \mathbf{B} = -\mathbf{C} \cdot \mathbf{B} \times \mathbf{A} = \mathbf{C} \times \mathbf{B} \cdot \mathbf{A} = \dots$$

Смешанное произведение трех векторов $\mathbf{A}$, $\mathbf{B}$ и $\mathbf{C}$ равно объему параллелепипеда, который построен на этих векторах, исходящих из одной точки.

Тензорное произведение: $\mathbf{AB}$. Для трехмерного случая тензорное произведение представляет собой матрицу 3×3 , получаемую согласно следующему правилу:

$$\mathbf{AB} = \begin{pmatrix} A_x \\ A_y \\ A_z \end{pmatrix} (B_x B_y B_z) = \begin{pmatrix} A_x B_x & A_x B_y & A_x B_z \\ A_y B_x & A_y B_y & A_y B_z \\ A_z B_x & A_z B_y & A_z B_z \end{pmatrix}$$

Заметим, что $\mathbf{BA} = (\mathbf{AB})^+$, где знак $+$ означает транспонирование.

Полный вывод выражения (8.10) весьма сложен. Читатель, хорошо знакомый с квантовой механикой и с теорией электромагнетизма, может обратиться, в частности, к книге Шеллмана (Schellman, 1975). Здесь мы остановимся на некоторых свойствах R_{0a} с тем, чтобы попытаться получить представление о физических основах оптической активности. Рассмотрим сначала более простое, чем для R_{0a} , выражение для интенсивности поглощения, которую мы можем связать с силой диполя¹⁾:

$$D_{0a} = \langle \Psi_0 | \underline{\mu} | \Psi_a \rangle \cdot \langle \Psi_a | \underline{\mu} | \Psi_0 \rangle$$

Из этого выражения следует, что поглощение пропорционально квадрату индуцированного светом момента перехода. В случае оптической активности один из матричных элементов оператора электрического дипольного момента заменяется матричным элементом оператора магнитного дипольного момента. Поскольку величина R_{0a} все же остается пропорциональной $\langle \Psi_0 | \underline{\mu} | \Psi_a \rangle$, молекула, не способная к поглощению, не будет обладать и КД, так как в этом случае величина $\langle \Psi_0 | \underline{\mu} | \Psi_a \rangle$ будет равна нулю. Для того чтобы R_{0a} была отлична от нуля, величина $\langle \Psi_a | \underline{m} | \Psi_0 \rangle$ также должна быть не равна нулю.

Световая волна представляет собой суперпозицию двух осциллирующих компонент — электрической и магнитной. Свойства поглощения как такового обычно определяются электрической компонентой, так как здесь магнитные эффекты оказываются заметно слабее электрических. Однако оптическая активность представляет собой явление, которое определяется как электрическими, так и магнитными взаимодействиями. Важнейшей особенностью уравнения (8.10) является то, что в его правой части стоит скалярное произведение. Это означает, что для появления (у молекулы) оптической активности необходимо, чтобы величина $\langle \Psi_a | \underline{m} | \Psi_0 \rangle$ обладала компонентой, параллельной $\langle \Psi_0 | \underline{\mu} | \Psi_a \rangle$.

¹⁾ Мы представляем здесь D_{0a} в явном виде как произведение матричного элемента оператора дипольного момента и комплексно сопряженной с ним величины [ср. с уравнением (7.40)], поскольку $\langle \Psi_0 | \underline{\mu} | \Psi_a \rangle = \langle \Psi_a | \underline{\mu} | \Psi_0 \rangle$. Однако это последнее равенство справедливо не для всех операторов. Например, из-за того, что оператор $\underline{m}$ мнимый, $\langle \Psi_a | \underline{m} | \Psi_0 \rangle = -\langle \Psi_0 | \underline{m} | \Psi_a \rangle$.

Следовательно, свет должен индуцировать движение заряда по винтовой линии, «обвивающей» направление $\langle \Psi_0 | \underline{\mu} | \Psi_a \rangle$ (рис. 8.3), а для этого молекула должна иметь асимметричную конфигурацию. Подобное рассмотрение является основополагающим для понимания природы оптической активности молекул. Оно также объясняет, почему многие спиральные макромолекулы обладают сильной оптической активностью: спиральная структура способствует перемещению зарядов по винтовой линии.

• ВЫЧИСЛЕНИЕ КД ДИМЕРА

Нас интересует не столько оптическая активность отдельных хромофоров как таковая, сколько *изменение* оптической активности, вызываемое объединением хромофоров в макромолекулярную структуру. Чтобы упростить рассмотрение, предположим, что мы имеем димер из двух одинаковых хромофоров. К этому случаю применимы те же волновые функции, которые использовались в гл. 7 для описания экситонных эффектов в димере. Имеются два однократно возбужденных состояния [уравнение (7.52)]. Нам нужно определить электрический и магнитный моменты перехода из состояния 0 в состояние А. Будем проводить вычисления сразу для обоих состояний, A^+ и A^- , помня, что верхний знак в соответствующих выражениях относится к состоянию $+$. Электрический момент перехода для димера можно выразить через соответствующие моменты переходов для мономеров:

$$\begin{aligned} \langle \Psi_0 | \underline{\mu} | \Psi_{A^\pm} \rangle &= \langle \phi_{10} \phi_{20} | \underline{\mu}_1 + \underline{\mu}_2 | (1/\sqrt{2})(\phi_{1a} \phi_{20} \pm \phi_{10} \phi_{2a}) \rangle \\ &= (1/\sqrt{2})(\langle \phi_{10} | \underline{\mu}_1 | \phi_{1a} \rangle \pm \langle \phi_{20} | \underline{\mu}_2 | \phi_{2a} \rangle) \end{aligned} \quad (8.12)$$

Оператор магнитного дипольного момента для димера имеет более сложный вид. Он представляет собой сумму операторов для мономеров, но, кроме того, зависит от расстояния между мономерами. Чтобы пояснить это, выберем для обоих мономеров общее начало координат так, как это представлено на рис. 8.4. Используя выражение (8.11), можно записать оператор дипольного магнитного момента в этой системе координат в следующем виде:

$$\begin{aligned} \underline{m} &= (e/2mc) \underline{r}'_1 \times \underline{p}_1 + (e/2mc) \underline{r}'_2 \times \underline{p}_2 \\ &= (e/2mc) \underline{r}_1 \times \underline{p}_1 + (e/2mc) \underline{r}_2 \times \underline{p}_2 + (e/2mc) \underline{R}_1 \times \underline{p}_1 + (e/2mc) \underline{R}_2 \times \underline{p}_2 \end{aligned} \quad (8.13)$$

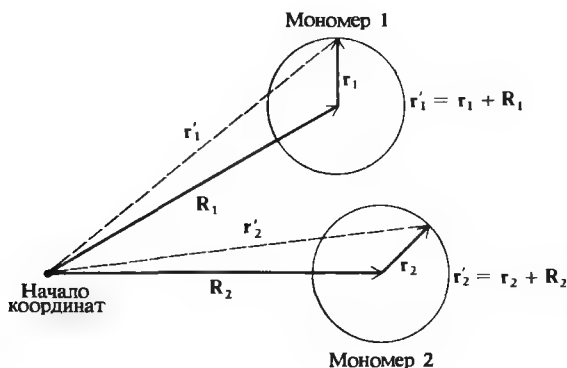


РИС. 8.4. Система координат, используемая при определении оператора магнитного дипольного момента для димера.

Поскольку первые два члена не зависят от выбора начала координат, мы можем выразить $\underline{m}$ как

$$\underline{m} = \underline{m}_1 + \underline{m}_2 + (e/2mc)\underline{R}_1 \times \underline{p}_1 + (e/2mc)\underline{R}_2 \times \underline{p}_2 \quad (8.14)$$

где $\underline{m}_1$ и $\underline{m}_2$ — одноэлектронные операторы магнитного дипольного момента мономеров. Они определены относительно центров мономеров. $\underline{R}_1$ и $\underline{R}_2$ — операторы координат, которые определяют положения центров мономеров; $\underline{p}_1$ и $\underline{p}_2$ — операторы импульса электрона относительно центра каждого из мономеров. Используя соотношение (8.14), можно найти магнитный момент перехода для димера, выразив его через соответствующие величины для отдельных мономеров:

$$\begin{aligned} \langle \Psi_{A^\pm} | \underline{m} | \Psi_0 \rangle &= (1/\sqrt{2}) \langle (\phi_{1a} \phi_{20} \pm \phi_{10} \phi_{2a}) | \underline{m} | \phi_{10} \phi_{20} \rangle = \\ &= (1/\sqrt{2}) (\langle \phi_{1a} | \underline{m}_1 | \phi_{10} \rangle \pm \langle \phi_{2a} | \underline{m}_2 | \phi_{20} \rangle + (e/2mc) \underline{R}_1 \times \langle \phi_{1a} | \underline{p}_1 | \phi_{10} \rangle \pm \\ &\quad \pm (e/2mc) \underline{R}_2 \times \langle \phi_{2a} | \underline{p}_2 | \phi_{20} \rangle) \end{aligned} \quad (8.15)$$

Если известны точные волновые функции, можно заменить матричный элемент оператора импульса $\langle \phi_{1a} | \underline{p}_1 | \phi_{10} \rangle$ величиной, пропорциональной соответствующему матричному элементу оператора электрического дипольного момента ¹⁾:

$$(e/2mc) \langle \phi_{1a} | \underline{p}_1 | \phi_{10} \rangle = (i\pi/\lambda_{0a}) \langle \phi_{1a} | \underline{\mu}_1 | \phi_{10} \rangle \quad (8.16)$$

где $\lambda_{0a} = c/\nu_{0a}$ — длина волны, отвечающая переходу из состояния 0 в состояние a в изолированном мономере. Используя это уравнение и аналогичное для $\langle \phi_{2a} | \underline{p}_2 | \phi_{20} \rangle$, можно переписать равенство (8.15) в виде

$$\begin{aligned} \langle \Psi_{A^\pm} | \underline{m} | \Psi_0 \rangle &= (1/\sqrt{2}) (\langle \phi_{1a} | \underline{m}_1 | \phi_{10} \rangle \pm \langle \phi_{2a} | \underline{m}_2 | \phi_{20} \rangle + \\ &\quad + (i\pi/\lambda_{0a}) (\underline{R}_1 \times \langle \phi_{1a} | \underline{\mu}_1 | \phi_{10} \rangle \pm \underline{R}_2 \times \langle \phi_{2a} | \underline{\mu}_2 | \phi_{20} \rangle)) \end{aligned} \quad (8.17)$$

Теперь осталось найти силы вращения переходов $0 \rightarrow A^\pm$ для димера. Из уравнения (8.10) [а также используя уравнения (8.12) и (8.17)] имеем

$$\begin{aligned} R_{0A^\pm} &= \text{Im} (\langle \Psi_0 | \underline{\mu} | \Psi_{A^\pm} \rangle \cdot \langle \Psi_{A^\pm} | \underline{m} | \Psi_0 \rangle) = \\ &= \frac{1}{2} \text{Im} ((\langle \phi_{10} | \underline{\mu}_1 | \phi_{1a} \rangle \pm \langle \phi_{20} | \underline{\mu}_2 | \phi_{2a} \rangle) \times \\ &\quad \times [\langle \phi_{1a} | \underline{m}_1 | \phi_{10} \rangle \pm \langle \phi_{2a} | \underline{m}_2 | \phi_{20} \rangle + \\ &\quad + (i\pi/\lambda_{0a}) (\underline{R}_1 \times \langle \phi_{1a} | \underline{\mu}_1 | \phi_{10} \rangle \pm \underline{R}_2 \times \langle \phi_{2a} | \underline{\mu}_2 | \phi_{20} \rangle)]) \end{aligned} \quad (8.18)$$

$$R_{0A^\pm} = \frac{1}{2} \text{Im} (\langle \phi_{10} | \underline{\mu}_1 | \phi_{1a} \rangle \cdot \langle \phi_{1a} | \underline{m}_1 | \phi_{10} \rangle + \langle \phi_{20} | \underline{\mu}_2 | \phi_{2a} \rangle \cdot \langle \phi_{2a} | \underline{m}_2 | \phi_{20} \rangle) \pm \quad (8.19a)$$

$$\begin{aligned} &\pm \frac{1}{2} \text{Im} (\langle \phi_{10} | \underline{\mu}_1 | \phi_{1a} \rangle \cdot \langle \phi_{2a} | \underline{m}_2 | \phi_{20} \rangle + \\ &\quad + \langle \phi_{20} | \underline{\mu}_2 | \phi_{2a} \rangle \cdot \langle \phi_{1a} | \underline{m}_1 | \phi_{10} \rangle) + \end{aligned} \quad (8.19b)$$

$$\begin{aligned} &+ (\pi/2\lambda) (\langle \phi_{10} | \underline{\mu}_1 | \phi_{1a} \rangle \cdot \underline{R}_1 \times \langle \phi_{1a} | \underline{\mu}_1 | \phi_{10} \rangle \pm \langle \phi_{10} | \underline{\mu}_1 | \phi_{1a} \rangle \cdot \underline{R}_2 \times \\ &\quad \times \langle \phi_{2a} | \underline{\mu}_2 | \phi_{20} \rangle \pm \langle \phi_{20} | \underline{\mu}_2 | \phi_{2a} \rangle \cdot \underline{R}_1 \times \langle \phi_{1a} | \underline{\mu}_1 | \phi_{10} \rangle + \\ &\quad + \langle \phi_{20} | \underline{\mu}_2 | \phi_{2a} \rangle \cdot \underline{R}_2 \times \langle \phi_{2a} | \underline{\mu}_2 | \phi_{20} \rangle) \end{aligned} \quad (8.19b)$$

¹⁾ Эту теорему легко доказать, если уметь обращаться с коммутаторами, такими как $[\underline{H}, \underline{r}]$ (см. какой-либо учебник по квантовой механике, например Mertzbacher, 1961, p. 453).

Третий член этого сложного выражения, (8.19в), можно существенно упростить. Как уже отмечалось, $\langle \phi_{1a} | \underline{\mu}_1 | \phi_{10} \rangle = \langle \phi_{10} | \underline{\mu}_1 | \phi_{1a} \rangle$; аналогичное равенство справедливо и для второго мономера. Смешанное произведение $\mathbf{A} \cdot \mathbf{B} \times \mathbf{C}$ обращается в нуль, когда два или более из перемножаемых векторов оказываются одинаковыми. Следовательно, первое и четвертое слагаемые в (8.19в) равны нулю. Остальные можно преобразовать, вспомнив, что смешанное произведение меняет знак при перестановке двух любых соседних сомножителей: $\mathbf{A} \cdot \mathbf{B} \times \mathbf{C} = -\mathbf{B} \cdot \mathbf{A} \times \mathbf{C} = \mathbf{B} \cdot \mathbf{C} \times \mathbf{A}$ и т. д. Таким образом, выражение (8.19в) сводится к виду

$$+ (\pi/2\lambda)(\pm \mathbf{R}_2 \cdot \langle \phi_{20} | \underline{\mu}_2 | \phi_{2a} \rangle \times \langle \phi_{10} | \underline{\mu}_1 | \phi_{1a} \rangle \pm \mathbf{R}_1 \cdot \langle \phi_{20} | \underline{\mu}_2 | \phi_{2a} \rangle \times \langle \phi_{10} | \underline{\mu}_1 | \phi_{1a} \rangle) \quad (8.19г)$$

Введя вектор $\mathbf{R}_{12} = \mathbf{R}_2 - \mathbf{R}_1$, соединяющий центры двух мономеров, упростим далее выражение (8.19г):

$$\pm (\pi/2\lambda) \mathbf{R}_{12} \cdot \langle \phi_{20} | \underline{\mu}_2 | \phi_{2a} \rangle \times \langle \phi_{10} | \underline{\mu}_1 | \phi_{1a} \rangle \quad (8.19д)$$

Несмотря на всю свою сложность, полученный результат имеет довольно простой физический смысл. В спектре КД димера будут проявляться две полосы, соответствующие двум экситонным полосам поглощения при переходе $0 \rightarrow A^\pm$. Каждый из трех членов в правой части (8.19) дает вклад в обе полосы. Первый член, (8.19а), представляет собой просто сумму КД двух изолированных мономеров; он называется одноэлектронным членом и обычно оказывается малым. На самом деле, если использовать более точные волновые функции, первый член будет содержать дополнительные слагаемые, отражающие возмущение обоих мономеров под действием электрического поля димера.

Второй член, (8.19б), отражает магнитно-электрическое взаимодействие. Он может оказаться весьма существенным, когда у одного из мономеров мал *магнитный* момент перехода, а у другого — *электрический*. У наиболее часто встречающихся хромофоров, однако, электрический момент перехода велик, а магнитный — мал, так что второй член обычно оказывается малым. Это означает, что КД димера определяется главным образом третьим членом, (8.19,в,д), называемым экситонным. Этот член зависит от расстояния между хромофорами и от геометрии молекул. Заметим, что даже в случае, когда мономеры не обладают оптической активностью, он может оказаться достаточно большим при соответствующей геометрии [уравнение (8.19д)].

Вклад в КД димера всех трех членов схематически изображен на рис. 8.5. Если главным является член (8.19д), полосы КД димера будут обладать одинаковой силой вращения и иметь противоположные знаки (на что указывают знаки $\pm$ перед этим членом). Суммарная сила вращения $R_{A+} + R_{A-}$ будет равна нулю, и такой спектр называется консервативным. Он изображен на рис. 8.6. для двух различных геометрий димера. Заметим, что, хотя сила вращения каждой из полос по отдельности может быть весьма большой, измеряемый КД оказывается значительно меньшим. Как явствует из уравнения (7.54), полосы отстоят друг от друга по энергии на величину небольшого расщепления ($2V_{12}$). Вследствие малости этого расщепления интенсивность экситонных полос КД из-за взаимного уничтожения соответствующих вкладов очень сильно уменьшается.

Согласно уравнению (8.19д), силы вращения обеих полос должны линейно возрастать с ростом расстояния между хромофорами. Однако из-за того, что расщепление пропорционально R_{12}^{-1} , реально наблюдаемый КД будет уменьшаться примерно как R^{-2} . Поскольку экситонное расщепление очень мало, его нелегко обнаружить при помощи обычных методов измерения поглощения. КД значительно усиливает этот эффект благодаря наличию

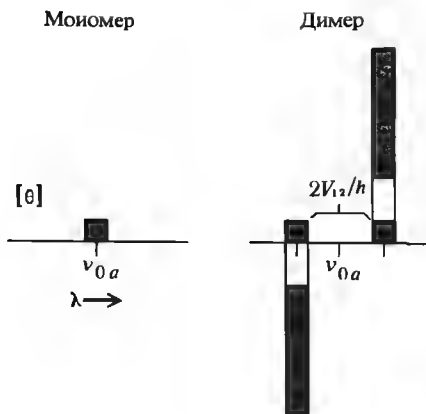


РИС. 8.5. Составляющие КД димера, соответствующие разным членам уравнения (8.19.). Спектр КД мономера состоит из одной полосы с частотой ν_{0a} [член (8.19a)]. В спектре димера имеются две полосы с частотами $\nu_{0a} \pm V_{12}/h$, отвечающие одноэлектронному члену [(8.19a), черный прямоугольник], магнитно-электрическому взаимодействию [(8.19б), светлый прямоугольник] и экситонному члену [(8.19д), цветной прямоугольник].

полос противоположного знака. Однако из-за того, что величина КД зависит как от V_{12} , так и от $R_{0A\pm}$, вклады этих двух эффектов бывает нелегко разделить. Спектры на рис. 8.6. моделируют такие комбинированные эффекты.

Ранее мы высказали общее утверждение, что для разрешенных переходов спектры поглощения и КД имеют одинаковую форму. Теперь мы видим, что взаимодействия между хромофорами — магнитно-электрические или экситонные — приводят к нарушению этого правила. Суммарный КД в интервале длин волн, где превалируют эти эффекты, близок к нулю. Подобный спектр обычно служит четким указанием на то, что имеет место взаимодействие хромофоров.

Член (8.19д) представляет собой смешанное произведение трех векторов; это означает, что для многих конформаций димера КД исчезает. Он будет равен нулю, когда хромофоры копланарны, параллельны или перпендикулярны друг другу. На рис. 8.7 приведены спектры КД димера для шести различных конфигураций, построенные с учетом лишь экситонного члена (8.19д). Из рисунка видно, что КД совокупности хромофоров действительно оказывается весьма чувствительным к конформации молекулы.

Часто мономерные хромофоры обладают малым (но не пренебрежимо малым) КД по сравнению с димером или полимером. В таких случаях обычно бывает удобно использовать разностный КД:

$$[\theta]' = [\theta]_{\text{димер}} - [\theta]_{\text{мономеры}} \quad (8.20)$$

Пока расщепление мало и вклад статических полей в одноэлектронный член (8.19а) отсутствует, $[\theta]'$ служит хорошим приближением для магнитно-электрического и экситонного членов. Соответствующий спектр будет консервативным, даже если наблюдаемый КД димера не является таковым.

КД биологических олигомеров и полимеров можно рассчитать аналогичным образом. Особенно благоприятными для конформационного анализа оказываются случаи, когда основной вклад в КД дает экситонный член (8.19д). При этом нет необходимости знать что-либо о магнитных моментах переходов, поскольку вклад от мономеров можно исключить процедурой вычитания (8.20). Электрический момент перехода любой полосы можно определить из спектра поглощения: $|\mu_{0a}| = (D_{0a})^{1/2}$. Его направление во многих случаях удается найти из спектров линейного дихроизма, как это было описано ранее. Следовательно, единственная величина, которую надо вычислять при помощи волновых функций, — это расщепление $2V_{12}$.

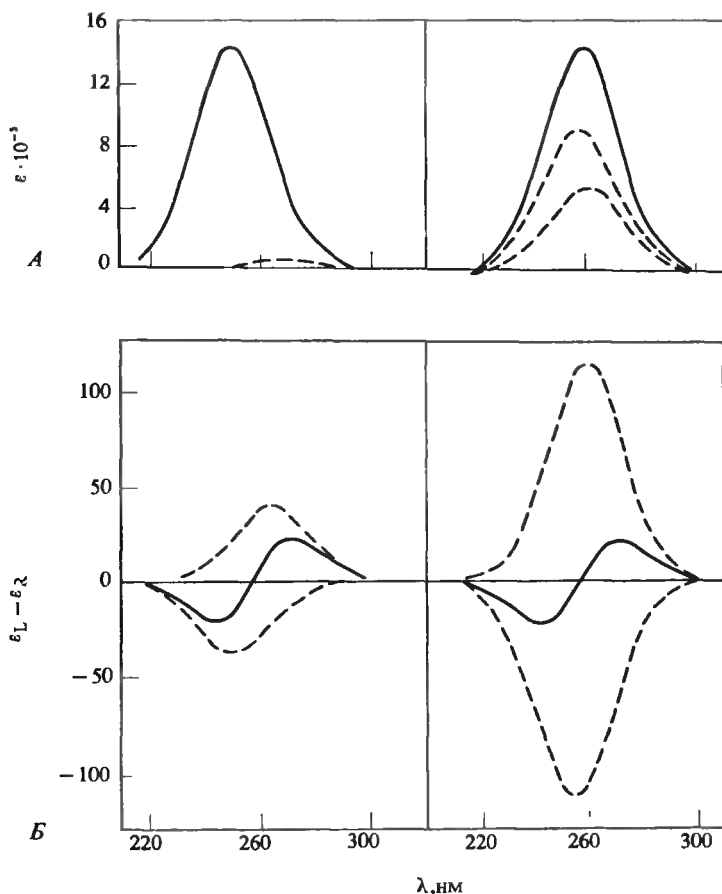


РИС. 8.6. Спектры димера, состоящего из двух идентичных хромофоров, полученные расчетным путем. А. Спектры поглощения. Б. Спектры КД. Сплошные кривые — суммарные ожидаемые спектры, штриховые кривые — вклады от двух экситонно расщепленных полос. Димер, спектры которого изображены слева, состоит из мономеров, расположенных под углом 15° , справа — под углом 75° . Заметим, что, несмотря на существенное различие в структуре, димеры имеют фактически одинаковые результирующие спектры, хотя отдельные их компоненты значительно различаются. Заметим также, что в спектре поглощения первого из упомянутых димеров интенсивность одной из полос очень мала. [I. Tinoco, Jr., C.R.Cantor, *Methods Biochem. Anal.*, 18, 81 (1970).]

Однако в действительности ситуация оказывается намного сложнее. Каждый мономер обладает более чем одной полосой поглощения. Поэтому нужно вычислять как магнитно-электрический, так и экситонный члены, которые учитывают взаимосвязь между каждой полосой одного мономера и всеми полосами других мономеров. Наиболее простым случаем, представляющим реальный биологический интерес, является КД полипептидов. Боковые группы такой молекулы, как поли-L-аланин, вносят лишь малый вклад в ее оптические свойства. Поэтому при анализе КД в ближней УФ-области можно учитывать только $\pi \rightarrow \pi^*$ - и $n \rightarrow \pi^*$ -переходы в полипептиде. На рис. 8.8 представлены результаты такого расчета и полученный экспериментально спектр КД α -спирального поли-L-аланина. Хоро-

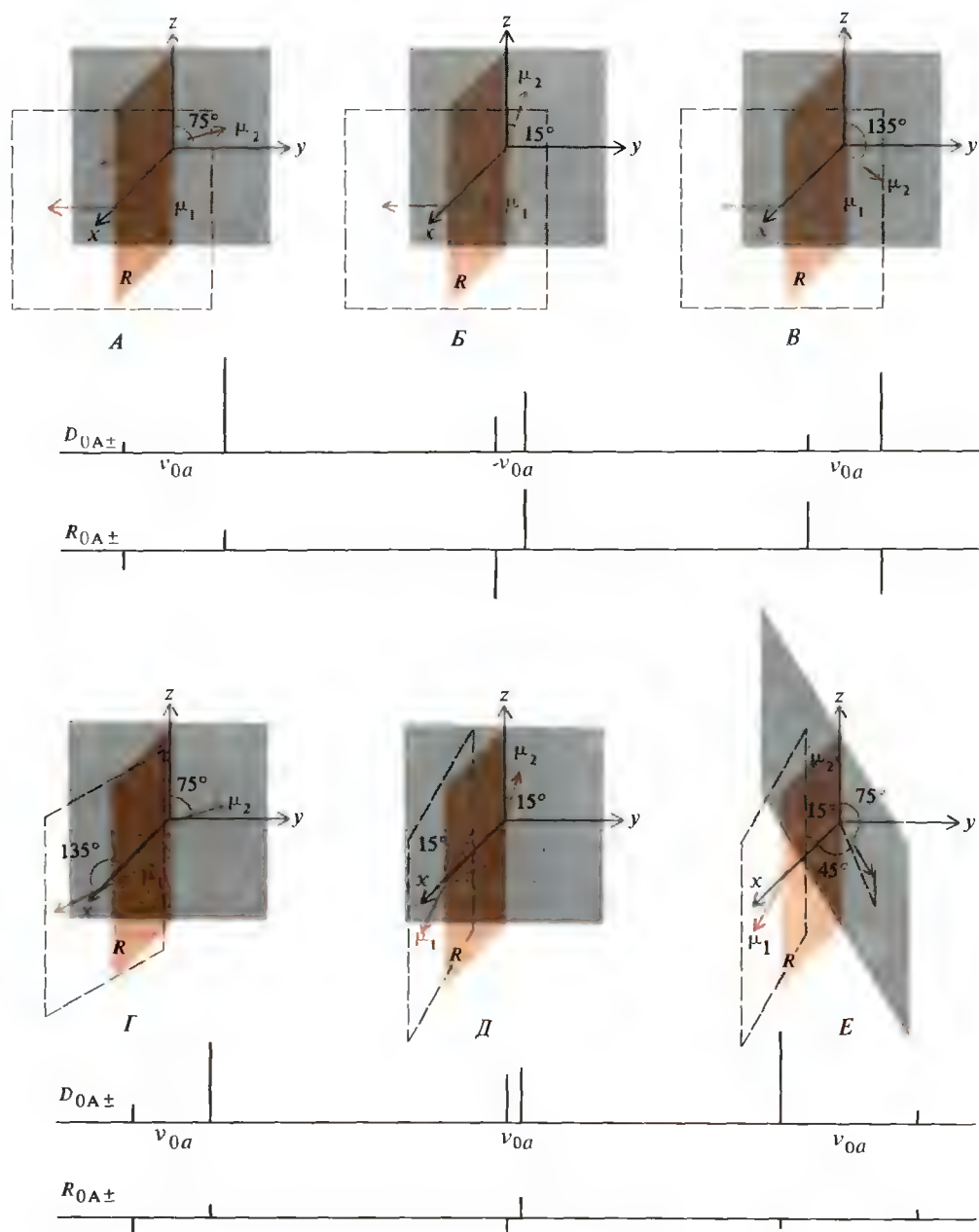


РИС. 8.7. Шесть различных конфигураций димера, состоящего из двух одинаковых хромофоров, и соответствующие силы диполя и силы вращения. При вычислении силы вращения учитывался лишь член (8.19д). А, Б, В. Оба момента переходов параллельны плоскости $y - z$ и, значит, перпендикулярны прямой (R), соединяющей хромофоров. Г, Д, Е. Хромофоров не образуют параллельные стопки. Во всех случаях частота соответствующей полосы в спектре мономера лежит точно посередине между частотами полос димера. [I. Tinoco, Jr., Radiation Res., 20, 133 (1963).]

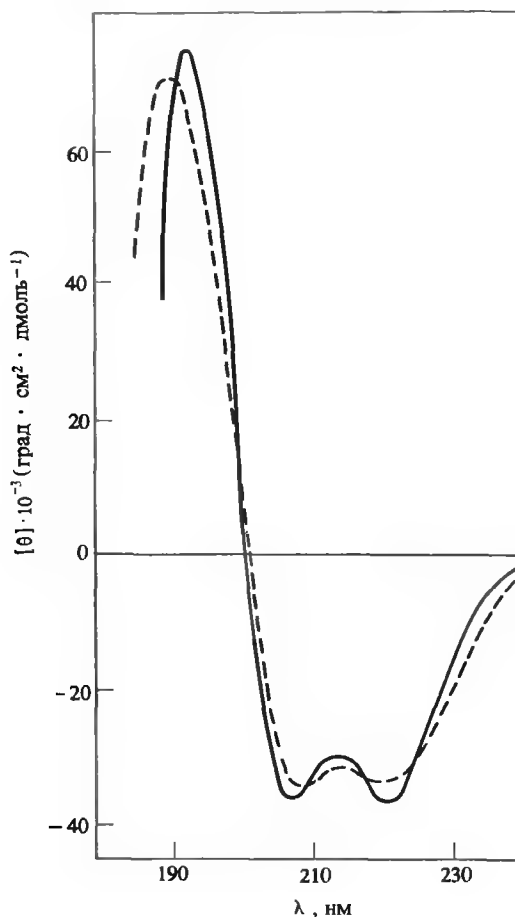


РИС. 8.8. Спектры КД поли-L-аланина в α -спиральной конформации. Сплошная кривая — экспериментально полученный спектр, штриховая — расчетный. [R.W.Woody, J.Chem. Phys., 49, 4797 (1968).]

шее соответствие теоретической и экспериментальной кривых демонстрирует те большие потенциальные возможности, которые дает использование данных по оптической активности при конформационном анализе.

ПОЛУЭМПИРИЧЕСКИЕ РАСЧЕТЫ ОПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКОВ

Квантовомеханический анализ спектров КД большинства биополимеров сопряжен с большими трудностями. Такие хромофоры, как азотистые основания нуклеиновых кислот и ароматические аминокислоты, гораздо сложнее пептидной группы. Здесь необходимо учитывать значительно большее число электронных состояний, моменты переходов для которых (а значит, поляризация и интенсивность) редко бывают известны с достаточной точностью. Тем не менее значительный по объему экспериментальный материал, накопленный при изучении оптической активности полипептидов, белков и нуклеиновых

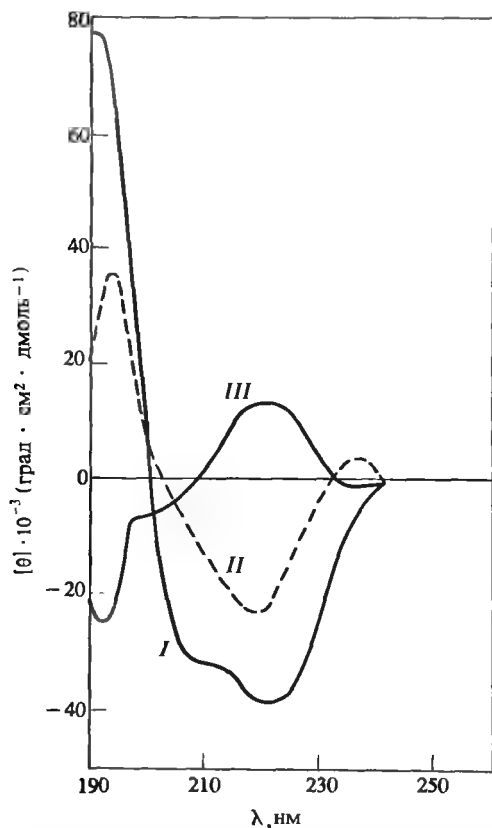


РИС. 8.9. Спектры КД α -спирали (I), β -слоя (II) и беспорядочной структуры (III), полученные на основании спектров белков с известной трехмерной структурой методом Ветлауфера. [V.P.Saxena, D.B.Wetlaufer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 66, 969 (1971).]

кислот, вместе с данными о трехмерной структуре многих биомолекул дали возможность развить целый ряд подходов, позволяющих предсказывать и анализировать оптические свойства не столь полно исследованных систем. Мы рассмотрим белки и нуклеиновые кислоты по отдельности, поскольку методы, наиболее успешно применяющиеся для исследования этих двух классов веществ, несколько различаются.

В случае белков главной целью измерений спектров КД и ДОВ является определение содержания вторичных структур разных типов. Если доля ароматических аминокислот в белке не очень велика, его оптическая активность в области от 190 до 230 нм определяется главным образом полипептидным остовом. Многочисленные эксперименты показали, что по крайней мере качественно природа алифатических боковых групп не влияет заметно на спектр КД в этой области. Следовательно, в первом приближении белковую молекулу можно рассматривать просто как линейную комбинацию участков остова, находящихся в конформациях α -спирали, β -слоя и беспорядочной структуры. КД этих структур можно оценить по результатам измерения КД гомополипептидов известной конформации. Такой набор «базисных» спектров приведен на рис. 8.9. Если содержание структур разных типов (χ_α , χ_β , χ_r) для данного белка известно, то можно вычислить КД при каждой длине волны, просуммировав соответствующие вклады:

$$[\theta(\lambda)] = \chi_\alpha[\theta_\alpha(\lambda)] + \chi_\beta[\theta_\beta(\lambda)] + \chi_r[\theta_r(\lambda)] \quad (8.21)$$

где $[\theta_\alpha]$, $[\theta_\beta]$ и $[\theta_\gamma]$ — КД полипептидов, находящихся в указанных конформациях. Такое же выражение справедливо и для ДОВ.

На практике гораздо чаще по спектру КД пытаются определить χ_α , χ_β и χ_γ , т.е. провести приближенный анализ вторичной структуры белка. Для этого проводят измерения при нескольких длинах волн (λ_i) и решают систему уравнений вида (8.21). Минимально необходимое число длин волн равно трем, но лучше использовать гораздо больший набор λ_i и применять метод наименьших квадратов или какую-либо иную статистическую процедуру для получения наиболее надежных значений долей каждого из типов вторичных структур¹⁾. Точность подобного расчета (даже в предположении, что все допущения верны) зависит от того, в какой степени базисные спектры $[\theta_\alpha]$, $[\theta_\beta]$ и $[\theta_\gamma]$ являются линейно независимыми функциями. К счастью, как явствует из рис. 8.9, эти спектры достаточно сильно различаются.

Рассмотренный подход имеет по меньшей мере два слабых места. КД α -спиралей и β -участков является функцией их длины. Модельные соединения, используемые для получения базисных спектров, представляют собой гомополимерные структуры гораздо больших размеров, чем длина типичных участков в глобулярных белках. В принципе эту трудность можно преодолеть, если ввести необходимое число дополнительных параметров. Однако недостаточная точность экспериментальных данных во многих случаях делает подобную процедуру неоправданной. Другой проблемой является то, что третичная структура типичного глобулярного белка представляет собой совокупность достаточно тесно упакованных участков с определенной вторичной структурой. Хотя вклад в КД от взаимодействий между хромофорами падает как квадрат расстояния между ними, должен существовать определенный вклад от взаимодействия и между участками с разной вторичной структурой; эти взаимодействия нельзя адекватно смоделировать, рассматривая протяженные гомополимеры.

Метод полуэмпирического расчета КД, с помощью которого удастся обойти обе эти трудности, был предложен Д. Ветлауфером. Для построения базисных спектров здесь используются не полипептиды, а набор различных белков с известной пространственной структурой, что позволяет получить достаточно надежные значения χ_α , χ_β и χ_γ . Зная экспериментальные спектры КД, можно, решая систему уравнений вида (8.21), найти $[\theta_\alpha(\lambda)]$, $[\theta_\beta(\lambda)]$ и $[\theta_\gamma(\lambda)]$, т.е. аппроксимировать спектры каждого из типов вторичных структур в том виде, как они существуют в реальных белках. Эта процедура автоматически включает в себя усреднение как по длинам отдельных участков, так и по третичным взаимодействиям. На рис. 8.9 изображен типичный базисный набор спектров КД, полученный на основании измерений спектров белков. Адекватность этого экспериментально полученного набора можно проверить, если вычислить КД других белков, не использованных при расчете базисных спектров. В табл. 8.1 представлены типичные данные, полученные как методом Ветлауфера, так и с использованием базисного набора полипептидных спектров. Видно, что оба метода дают достаточно хорошие результаты.

ПОЛУЭМПИРИЧЕСКИЕ РАСЧЕТЫ ОПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

В отличие от белков при рассмотрении КД нуклеиновых кислот нельзя игнорировать спектральные различия между отдельными мономерными звеньями. Во всех обычно

¹⁾ Рациональнее всего представить искомые доли вторичных структур в виде трехкомпонентного вектора χ , а измеряемый при i различных длинах волн КД — в виде вектора θ с числом компонент i . Тогда базисный набор КД будет представлять собой матрицу $\mathbf{M}$ размерности $i \times 3$, а уравнение (8.21) запишется в виде $\theta = \mathbf{M} \cdot \chi$. Решая это уравнение относительно χ , получим $\chi = (\mathbf{M}\mathbf{M}^+)^{-1} \mathbf{M}^+ \cdot \theta$, где $\mathbf{M}^+$ — транспонированная матрица, а $\mathbf{M}^{-1}$ — обратная. Это выражение является алгебраическим эквивалентом метода наименьших квадратов.

Таблица 8.1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ
НА ОСНОВАНИИ ИЗМЕРЕНИЙ КД

Метод	Структура	Белок			
		карбоксипептидаза	α -химотрипсин	миоглобин	лизосим
Рентгеноструктур- ный анализ	α -спираль	23	8	~ 68	28
	β -Слой	18	22	0	10
	Беспорядочная конформация	59	70	~ 32	62
	+ другие структуры				
Для построения базисного набора использован спектр КД поли-L-лизина	α -Спираль	13	12	68	29
	β -Слой	31	23	5	11
	Беспорядочная конформация	56	65	27	60
Для построения базисного набора использованы спектры КД белков	α -Спираль	26	20	— ¹⁾	— ¹⁾
	β -Слой	18	20	— ¹⁾	— ¹⁾
	Беспорядоч- ная конформация	56	60	— ¹⁾	— ¹⁾

¹⁾ Результаты, полученные в этих случаях, не могут служить свидетельством в пользу или против данного метода, поскольку спектры КД этих белков входили в исходный базисный набор.

встречающихся вторичных структурах полинуклеотидов основания оказываются вовлеченными в непосредственные взаимодействия друг с другом. Для объяснения спектров КД и ДОВ необходимо не только учитывать относительное содержание оснований, но и располагать некоторой информацией относительно их последовательности. Спектр КД динуклеозидфосфата (например, ApG) в водном растворе заметно отличается от суммы спектров КД мономеров A и G. Взаимодействие между уложенными в стопку основаниями приводит к существенному изменению спектра КД даже в случае таких коротких олигомеров. Спектр КД для ApG можно описать, если учесть соответствующие вклады от двух мономеров и вклад, отвечающий взаимодействию между основаниями:

$$2[\theta_{\text{ApG}}(\lambda)] = [\theta_{\text{A}}(\lambda)] + [\theta_{\text{G}}(\lambda)] + I_{\text{AG}}(\lambda) \quad (8.22)$$

Аналогично для динуклеотида GrU имеем ¹⁾

$$2[\theta_{\text{GrU}}(\lambda)] = [\theta_{\text{G}}(\lambda)] + [\theta_{\text{U}}(\lambda)] + I_{\text{GU}}(\lambda) \quad (8.23)$$

Для тринуклеотида (например, ApGrU) нужно учесть вклад от трех мономеров, двух взаимодействий между соседними основаниями и от взаимодействия между основаниями,

¹⁾ Наличие множителей 2 и 3 в левых частях уравнений (8.22) — (8.24) связано с тем, что измеряемый КД выражается в единицах, приходящихся на один моль остатков. Истинная молярная эллиптичность димера больше этой величины.

расположенными через одно, А и U:

$$3[\theta_{\text{ArGrU}}(\lambda)] = [\theta_{\text{A}}(\lambda)] + [\theta_{\text{G}}(\lambda)] + [\theta_{\text{U}}(\lambda)] + I'_{\text{AG}}(\lambda) + I'_{\text{GU}}(\lambda) + I''_{\text{AU}}(\lambda) \quad (8.24)$$

Предположим, что взаимное расположение соседних оснований в тримере и димере одинаково. В таком случае взаимодействие между соседними хромофорами в этих двух структурах также будет примерно одинаковым: $I'_{\text{AG}}(\lambda) = I_{\text{AG}}(\lambda)$, $I'_{\text{GU}}(\lambda) = I_{\text{GU}}(\lambda)$. Поскольку энергия этих взаимодействий уменьшается с расстоянием, взаимодействием между расположенными через одно основаниями в стопкообразных спиральных можно пренебречь. Тогда из простого сопоставления выражений (8.22)—(8.24) получим

$$3[\theta_{\text{ArGrU}}(\lambda)] = 2[\theta_{\text{ArG}}(\lambda)] + 2[\theta_{\text{GrU}}(\lambda)] - [\theta_{\text{G}}(\lambda)] \quad (8.25)$$

Из этого уравнения следует, что можно оценить КД тримера ArGrU, измерив спектры КД двух димеров, ArG и GrU, и мономера U. Точно такие же выражения применимы и в случае спектров ДОВ и поглощения. Пример подобных расчетов представлен на рис. 8.10. Их результаты оказываются довольно хорошими. Заметим, что другие вычисления и эксперименты свидетельствуют о высокой чувствительности КД к последовательности оснований в олигонуклеотидах. Эта чувствительность и является причиной того, почему для расчетов спектров олигонуклеотидов необходимы относительно более сложные подходы.

Общий подход, основанный на использовании уравнения (8.25), может быть распространен на полимерные молекулы ДНК и РНК. При этом необходимо рассмотреть структуры по меньшей мере трех типов. Спектр беспорядочного клубка можно получить простым сложением спектров (с определенными весами) четырех мономеров. Спектр одноцепочечной стопкообразной спирали определяется вкладами от каждого из 16 возможных динуклеотидов, взятыми с весами, которые отвечают частотам их встречаемости. Двухцепочечные спирали рассматриваются аналогичным образом, но учитывается еще 10 возможных двухцепочечных димеров (ArG образует пару с CpU и т. д.). Поскольку такие комплексы слишком нестабильны, чтобы их спектры можно было прямо измерить, их оптические свойства приходится оценивать по данным для двухцепочечных молекул большего размера. Это делается точно таким же способом, как при получении полипептидных базисных спектров из спектров белков.

Чтобы рассчитать КД такой молекулы, как тРНК, которая содержит как двух-, так и одноцепочечные участки, приходится учитывать до 30 различных вкладов. Столь полное рассмотрение редко удается провести. Можно упростить задачу, объединив все эти вклады в два усредненных спектра, отвечающие одно- и двухцепочечным участкам, однако такой подход оказывается полезным лишь для полуколичественных оценок и недостаточно точен, чтобы с его помощью определить истинное число пар оснований в тРНК. Реальное упрощение возможно при рассмотрении РНК большего размера, поскольку здесь влияние разных сочетаний оснований в значительной степени усредняется.

В случае ДНК применим несколько иной подход, так как здесь длина молекулы достаточно велика и можно пренебречь концевыми эффектами. Когда молекула является строго двухцепочечной, имеется восемь линейно независимых базисных спектров, которые могут быть получены из спектров полинуклеотидов с регулярной последовательностью. КД природных ДНК удается оценить достаточно надежно, если вычисления основываются на спектрах ДНК, которые содержат в обеих цепях как пурины, так и пиримидины. Такие полимеры, как poly(dA · dT), не подходят для получения базисных спектров, поскольку их структура в общем отличается от структуры природных ДНК. Например, если бы структура трех приведенных ниже синтетических полимеров была одинаковой, то должно было бы выполняться следующее соотношение:

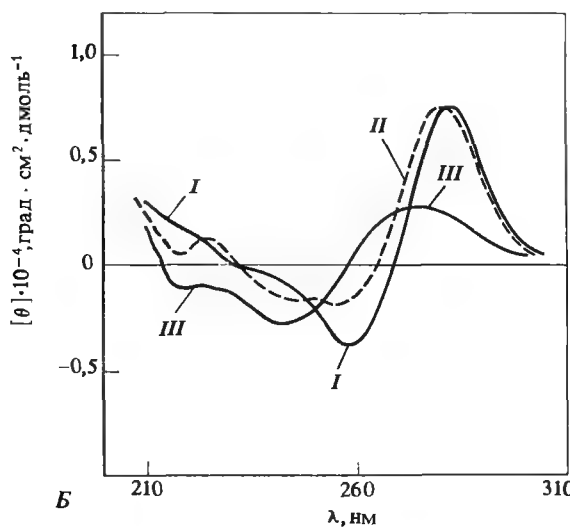
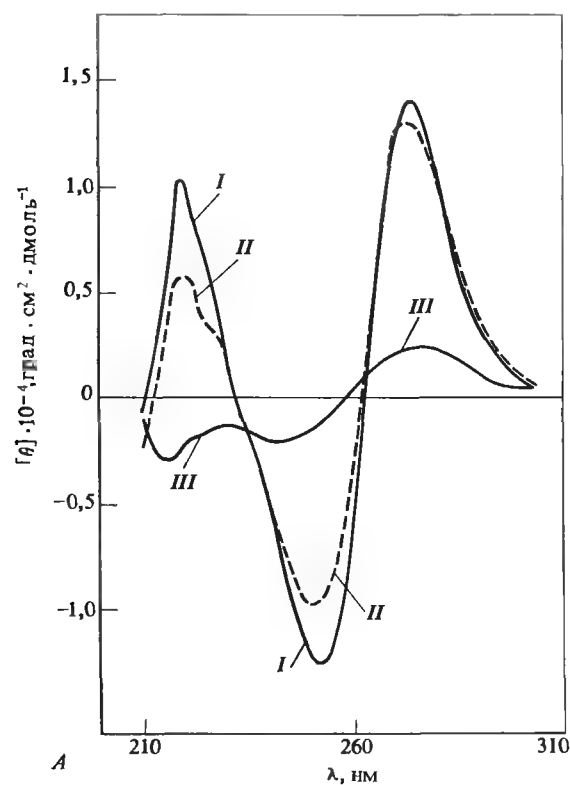


РИС. 8.10. Спектры КД двух дезокситри-
нуклеозиддифосфатов: dArTrpT (А) и
dGrTrpT (Б). I — экспериментально полу-
ченные спектры, II — спектры, постро-
енные при помощи полуэмпирического ме-
тода, описанного в тексте, III — резуль-
тат суммирования спектров составля-
ющих мономеров. [C.R.Cantor et al.,
Biopolymers, 9, 1059 (1976).]

$$\begin{array}{l}
 \text{КД} \quad 3[\theta_{\text{poly dAAT} \cdot \text{dTТА}}] = 2[\theta_{\text{poly dAT} \cdot \text{dTА}}] + [\theta_{\text{poly dA} \cdot \text{dT}}] \\
 \text{Структура} \quad \cdots \text{ААТААТААТ} \cdots \quad \cdots \text{АТАТАТАТА} \cdots \quad \cdots \text{ААААААААА} \cdots \\
 \quad \quad \quad \cdots \text{ТТАТТАТТА} \cdots \quad \cdots \text{ТАТАТАТАТ} \cdots \quad \cdots \text{ТТТТТТТТТ} \cdots
 \end{array} \quad (8.26)$$

Однако уравнение (8.26) не очень хорошо описывает экспериментальные результаты, очевидно, потому, что $dA \cdot dT$ отличается по своей структуре от двух других спиралей.

ПРИМЕНЕНИЕ ОПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРИ ЭМПИРИЧЕСКИХ РАСЧЕТАХ

Во многих случаях знаний о хромофорах оптически активной системы недостаточно для надежного предсказания спектра КД, так же как данных по гомологичным системам порой оказывается недостаточно для проведения полуэмпирических расчетов. И все же измерение оптической активности может быть использовано как удобный метод выявления конформационных изменений и исследования локального окружения хромофоров. В последующих главах мы рассмотрим кинетику и термодинамику конформационных изменений. При выполнении подобных экспериментов необходимо проследить за изменениями структурных параметров в зависимости от времени, температуры и других переменных. Если система содержит несколько компонентов (например, состоит из участков с разной конформацией), то ее поглощение или оптическая активность всегда будут представлять собой просто среднее арифметическое соответствующих величин. Например, $[\theta] = \sum \chi_i \theta_i$, где χ_i — мольная доля i -го компонента, θ_i — КД этого компонента. При удачном выборе длин волн можно следить за каждым компонентом независимо.

Даже при образовании крупных комплексов (например, комплексов субъединиц) спектры КД остаются чувствительными главным образом к локальным взаимодействиям. Таким образом, изменения КД отражают в основном изменения локальной структуры, если таковые происходят. Главным преимуществом КД по сравнению с другими методами регистрации конформационных изменений является его очень высокая чувствительность. Даже когда невозможно дать детальную структурную интерпретацию, изменения в структуре почти наверняка проявятся в виде изменения КД.

КД с успехом применяется еще в одной области — при изучении связывания белков и нуклеиновых кислот с малыми молекулами, причем наиболее удобны для таких исследований малые молекулы, которые поглощают видимый свет. КД оптически активных малых молекул может изменяться при связывании с макромолекулами либо в силу электронных взаимодействий с их центром связывания, либо из-за конформационных изменений, которые они претерпевают при связывании. Эти изменения легко обнаружить, поскольку большинство обычных биополимеров не обладают КД в видимой области.

Особенно удобно изучать оптически *неактивные* малые молекулы. Индуцированный КД у таких молекул обычно проявляется при связывании в силу тех же причин, что и в упомянутом случае оптически активных малых молекул, однако его величина в полосе поглощения отражает свойства исключительно связывающего вещества. Это облегчает выявление эквивалентных центров связывания, а также определение количества связанных лигандов. Если все центры сходны, индуцированный КД малых молекул будет равен $\theta = C_{\text{св}}[\theta_{\text{св}}]/100$, где $C_{\text{св}}$ — концентрация связанных малых молекул, $[\theta_{\text{св}}]$ — КД комплекса (определяемый по выходу спектра на насыщение при добавлении к малым молекулам избытка полимера), l — длина оптического пути. Если $[\theta_{\text{св}}]$ известен, можно, измерив θ , найти $C_{\text{св}}$, а затем константы связывания и, наконец, кажущиеся термодинамические величины, характеризующие процесс связывания в равновесии.

Когда малые молекулы связываются на асимметричных центрах полимера, в индуцированный КД вносят свой вклад несколько факторов. Влияние окружения учитывается членами одноэлектронного типа. Кроме того, если энергетические уровни хромофоров белка или нуклеиновой кислоты близки к уровням малой молекулы, существенный вклад в индуцированный КД будут вносить экситонные эффекты. Например, оптическая активность групп гема в гемоглобине обусловлена в основном взаимодействием с соседними тирозиновыми остатками белка.

ДРУГИЕ РАЗНОВИДНОСТИ МЕТОДА ИЗМЕРЕНИЯ ОПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

В магнитном поле оптическая активность становится еще более сложным явлением: в этих условиях даже у оптически неактивных молекул проявляются КД и ДОВ, а у молекул, обладающих оптической активностью, помимо полос естественного КД, наблюдаются новые, магнитоиндуцированные полосы. Спектроскопия магнитного КД и магнитной ДОВ разработана пока не так хорошо, как спектроскопия естественной оптической активности, но в будущем эти методы, по-видимому, найдут широкое применение.

Операторы, фигурирующие в теории естественной оптической активности, на самом деле являются тензорами, а не скалярами. В обычном изотропном растворе хаотическая ориентация молекул приводит к усреднению тензорных свойств, в результате чего измеряемой величиной служит след (сумма диагональных элементов) тензора оптической активности. Чтобы получить более полное представление о системе, необходимо измерить отдельные элементы тензора. Для этого можно исследовать оптическую активность ориентированных образцов. Результаты подобных экспериментов требуют особенно тщательной обработки, поскольку система помимо кругового дихроизма теперь обладает также линейным дихроизмом, и эти эффекты необходимо разделить. Все эти приемы позволяют глубже понять природу электронных состояний полимера.

Если оптически активная система обладает способностью к флуоресценции (см. следующий раздел), то оказывается возможным измерить еще два параметра оптической активности. Предположим, что для возбуждения используется свет с круговой поляризацией, а весь излученный свет удается регистрировать. Поскольку интенсивность излучения пропорциональна количеству поглощенного света, разность интенсивностей излучения, отвечающих возбуждению при помощи лево- и правополяризованного света, будет давать разностный спектр поглощения (в данном случае — КД) только флуоресцирующих хромофоров. Так, например, если молекула белка содержит два остатка триптофана, из которых лишь один является флуоресцирующим, обычный КД будет просто суммой КД обоих этих остатков. КД, регистрируемый по флуоресценции, будет относиться только к одному из остатков триптофана; КД другого можно найти путем вычитания. Для возбуждения можно использовать неполяризованный свет, но измерять разность интенсивностей лево- и правополяризованного излучаемого света. Такой подход позволяет получить КД хромофора, отвечающий его конфигурации в возбужденном состоянии, в отличие от всех прочих методов измерения КД, регистрирующих конфигурации основного состояния (см. Steinberg, 1978).

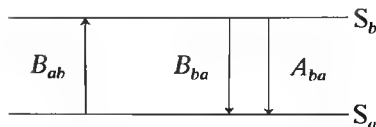
Наконец, упомянем о КД в инфракрасной области. Этот метод пока только разрабатывается, но со временем он обещает превратиться в новое средство получения информации о структуре больших и малых молекул.

8.2. Флуоресцентная спектроскопия

При испускании света молекулами проявляются совершенно другие их свойства, чем при поглощении. Процессы испускания охватывают сравнительно протяженный период времени. За это время в системе успевает произойти целый ряд перестроек и взаимодействий, влияющих на спектры флуоресценции.

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Рассмотрим гипотетическую молекулу с двумя энергетическими уровнями S_a и S_b :



В разд. 7.1 мы показали, что свет с плотностью излучения $I(\nu)$ вызывает переход с уровня S_a на уровень S_b со скоростью B_{ab} на молекулу. Обратный процесс $S_b \rightarrow S_a$ происходит с той же самой скоростью; таким образом, $B_{ab} = B_{ba}$. Пусть в исходной системе n_a молекул находятся в состоянии S_a и n_b в состоянии S_b . Тогда скорости соответствующих переходов равны $n_a B_{ab} I(\nu)$ и $n_b B_{ba} I(\nu)$. В равновесии эти скорости должны быть одинаковы, т.е. $n_a B_{ab} I(\nu) = n_b B_{ba} I(\nu)$ и $n_a = n_b$ независимо от плотности света. Мы получили абсурдный результат. В отсутствие возбуждающего света все молекулы должны, очевидно, находиться в основном состоянии S_a . При низких интенсивностях n_a и n_b едва ли будут отклоняться от равновесных значений. Эти значения можно найти из статистической механики. В отсутствие вырождения экспоненциальный больцмановский множитель имеет вид

$$n_a/n_b = e^{-(E_a - E_b)/kT} = e^{h\nu/kT} \quad (8.27)$$

где h — постоянная Планка.

Первым, кто указал, что противоречие разрешается, если ввести понятие о скорости спонтанного испускания фотона из состояния S_b , был Альберт Эйнштейн. Скорость этого процесса (A_{ba}) не должна зависеть от $I(\nu)$. Учитывая спонтанное излучение, запишем условие равновесия в виде равенства скоростей прямого и обратного переходов между состояниями S_a и S_b :

$$n_a/n_b = [B_{ba}I(\nu) + A_{ba}]/B_{ab}I(\nu) = 1 + A_{ba}/B_{ab}I(\nu) \quad (8.28)$$

Приравнявая правые части выражений (8.27) и (8.28), мы можем найти A_{ba} . Для этого вначале введем величину плотности излучения абсолютно черного тела ¹⁾ при температуре T :

$$I(\nu) = 8\pi h\nu^3/c^3(e^{h\nu/kT} - 1) \quad (8.29)$$

Подставляя это выражение в уравнение (8.28), находим

$$n_a/n_b = 1 + A_{ba}/B_{ab}I(\nu) = 1 + A_{ba}(e^{h\nu/kT} - 1)/8\pi h\nu^3 c^{-3} B_{ab} \quad (8.30)$$

Приравняв правые части выражений (8.27) и (8.30), мы получим

$$A_{ba} = 8\pi h\nu^3 c^{-3} B_{ab} \quad (8.31)$$

Отметим, что A_{ba} зависит от частоты в третьей степени. Это означает, что при малых длинах волн A_{ba} много больше, чем B_{ab} . Существенно, что все излучение является спонтанным. Ранее [уравнение (7.29)] мы показали, что $B_{ab} = (2\pi/3\hbar^2)D_{ab}$. Таким образом,

$$A_{ba} = (32\pi^3 \nu^3/3c^3 \hbar) D_{ab} \quad (8.32)$$

¹⁾ Плотности излучения и поглощения в условиях равновесия должны совпадать. Плотность излучения объекта, находящегося в равновесии при температуре T , описывается уравнением (8.29). [см. R.P. Feynman, R.B. Leighton, M. Sands, The Feynman Lectures on Physics, vol. 1, Reading, Mass., Addison-Wesley, 1963, chaps. 41-42. Имеется перевод: Фейнман Р., Лейтон Р., Сэндс М. Фейнмановские лекции по физике. — М.: Мир, 1966.]

Так как силу диполя (D_{ab}) и частоту (ν) обычно можно найти из спектров поглощения, скорость спонтанного излучения удастся определить, не регистрируя само излучение. В отсутствие облучения или каких-либо других возмущений или взаимодействий скорость дезактивации молекулы, изначально находившейся в состоянии S_b , будет равна

$$dn_b/dt = -A_{ba}n_b \quad (8.33)$$

Решением этого дифференциального уравнения является функция $n_b(t) = n_b(0)e^{-A_{ba}t}$, где $n_b(0)$ — концентрация молекул в возбужденном состоянии при $t = 0$. Таким образом, мы можем определить радиационное время жизни для состояния S_b как

$$\tau_R = 1/A_{ba} \quad (8.34)$$

Сила диполя D_{ab} непосредственно связана с интенсивностью поглощения. Из уравнения (8.32) следует, что D_{ab} и A_{ba} пропорциональны. Таким образом, уравнение (8.34) показывает, что чем сильнее поглощает данная изолированная молекула, тем быстрее происходит излучение. Заметим, однако, что уравнение (8.34) справедливо, только когда излучение сопровождается переходом молекулы именно из того электронного состояния, в которое она перешла при поглощении кванта. Это условие не всегда выполняется. При более тщательном анализе наряду с электронными переходами необходимо учитывать и колебательные. Экспериментально наблюдаемое время жизни возбужденного синглетного состояния, как правило, меньше радиационного времени жизни, определяемого из уравнения (8.34). Это обусловлено потерей энергии возбуждения не только из-за прямого излучения света, но и в ходе множества других процессов (рис. 8.11). Мы обсудим каждый из этих процессов более подробно, так как с их помощью в принципе можно получить полезную информацию о свойствах биологических систем.

Когда вынужденным излучением можно пренебречь, собственно константу скорости флуоресценции (k_F) можно оценить, исходя из сказанного выше, как

$$k_F = A_{ba} = 1/\tau_R \quad (8.35)$$

Безызлучательные процессы, конкурирующие с флуоресценцией, — это внутренняя конверсия (k_{ic}), интеркомбинационная конверсия в триплетное состояние (k_{is}) и различные процессы тушения флуоресценции [$k_q(Q)$]. Все эти процессы непосредственно конкурируют за дезактивацию возбужденных молекул. Следовательно, доля возбужденных молекул, дезактивированных посредством флуоресценции, которая называется квантовым выходом флуоресценции ϕ_F , равна

$$\phi_F = k_F/[k_F + k_{ic} + k_{is} + k_q(Q)] \quad (8.36)$$

Квантовый выход флуоресценции равен отношению числа излученных системой фотонов к числу поглощенных фотонов.

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Рассмотрим теперь подробнее факторы, влияющие на интенсивность флуоресценции.

1. Внутренняя конверсия, характеризующаяся константой скорости k_{ic} . В ходе этого процесса энергия возбуждения молекулы теряется при столкновении с молекулами растворителя или рассеивается по внутренним колебательным степеням свободы. Вообще говоря, k_{ic} растет с повышением температуры, и, следовательно, наблюдаемая интенсивность флуоресценции будет при этом уменьшаться. Для других спектроскопических явлений, обсуждавшихся выше, такая собственная температурная зависимость нехарактерна. Она может серьезно осложнить применение флуоресценции для исследования конформа-

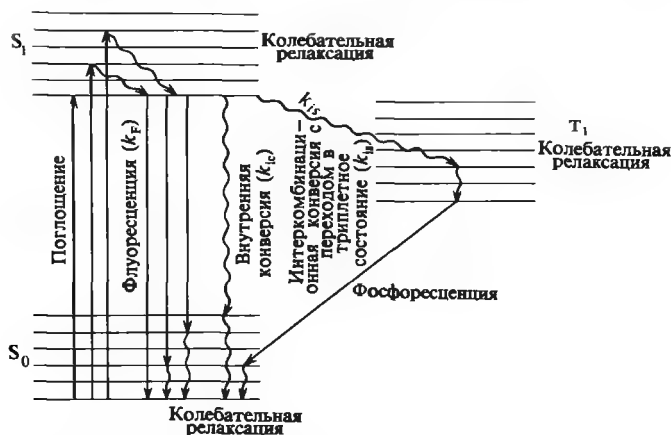


РИС. 8.11. Пути перехода молекулы в возбужденное состояние и обратно. (C.R.Cantor, T.Tao. In: Procedures in Nucleic Acid Research, vol.2, New York, Harper and Row, 1971, p.31.)

ционных перестроек, которые происходят в макромолекулах при изменении температуры.

2. Деактивация в результате столкновений или образования комплексов с растворенными молекулами (Q), приводящих к тушению флуоресценции, характеризуемая константой скорости $k_q(Q)$. В отличие от всех других процессов тушение при столкновении в принципе может представлять собой бимолекулярную реакцию



Поскольку Q всегда присутствует в избытке по сравнению с S_b , наблюдаемая скорость деактивации в действительности будет отвечать кинетике псевдопервого порядка. Величину k_q можно получить путем измерения зависимости квантового выхода флуоресценции ϕ_F от концентрации тушителя Q. Радиационное время жизни ароматических хромофоров обычно лежит в пределах от $1 \cdot 10^{-9}$ до $100 \cdot 10^{-9}$ с. Следовательно, тушение должно весьма эффективно конкурировать с флуоресценцией. Почти каждое столкновение таких часто используемых тушителей, как O_2 и ион I^- , с находящейся в синглетном возбужденном состоянии молекулой приводит к ее деактивации. Частота столкновений лимитируется только диффузией и при миллимолярных концентрациях тушителя иногда достигает 10^8 c^{-1} , т.е. тушение может быть весьма эффективным.

3. Интеркомбинационная конверсия с константой скорости k_{is} . При этом происходит формально запрещенный переход с изменением спина из возбужденного синглетного состояния в возбужденное триплетное. Из этого состояния молекула может перейти в основное синглетное состояние (S_0) либо путем фосфоресценции (испускание фотона), либо безызлучательным путем. Триплетное состояние обычно ниже по энергии возбужденного синглетного состояния. Следовательно, спектр фосфоресценции сдвинут в более длинноволновую область и его легко отличить от спектра флуоресценции.

Вероятность прямого перехода из основного синглетного состояния в возбужденное триплетное чрезвычайно мала. Поэтому триплетные состояния выявляются лишь при излучении. Другим следствием малой интенсивности поглощения является чрезвычайно большое радиационное время жизни молекулы в триплетном состоянии: это время дости-

гает секунд и более, в то время как для синглетных состояний характерны времена порядка наносекунд. Это означает, что столкновение с тушителями или внутренняя конверсия смогут весьма эффективно конкурировать с фосфоресценцией. Именно поэтому фосфоресценция в растворах наблюдается довольно редко. Чтобы увеличить интенсивность фосфоресценции, обычно приходится использовать твердые стекла при низких температурах и по возможности избавляться от кислорода. Поскольку такие условия, как правило, неприемлемы для биологических систем, мы рассмотрим в основном только флуоресцентные методы.

Из-за наличия безызлучательных процессов дезактивация возбужденного синглетного состояния будет происходить быстрее, чем это можно ожидать исходя из его радиационного времени жизни. Кинетическое уравнение, описывающее убывание числа молекул в возбужденных синглетных состояниях $S_b(t)$, можно получить, проведя суммирование по всем параллельным путям дезактивации:

$$-d(S_b)/dt = [k_F + k_{ic} + k_{is} + k_q(Q)](S_b) \quad (8.38)$$

Решение этого уравнения имеет вид

$$(S_b(t)) = (S_b(0))e^{-t/\tau_F} \quad (8.39)$$

где $(S_b(0))$ — концентрация при $t = 0$, τ_F — наблюдаемое время затухания флуоресценции

$$\tau_F = [k_F + k_{ic} + k_{is} + k_q(Q)]^{-1} \quad (8.40)$$

Сопоставляя величины τ_F , τ_R и ϕ_F , получаем

$$\phi_F = \tau_F/\tau_R \quad (8.41)$$

Поскольку в принципе τ_R можно найти из спектров поглощения, измерение времени затухания флуоресценции (τ_F) равносильно измерению квантового выхода (ϕ_F).

До сих пор мы учитывали только один колебательный подуровень каждого из состояний S_a и S_b . Рис. 8.12 иллюстрирует влияние на флуоресценцию других электронных и колебательных уровней. Внутренняя конверсия между более высокими синглетными состояниями, такими, как S_c и S_b , происходит гораздо быстрее, чем процессы, которые мы рассматривали до сих пор. Аналогично колебательная релаксация с более высоких колебательных подуровней каждого электронного состояния на основной колебательный подуровень происходит до испускания фотона. В результате все наблюдаемое излучение связано обычно с переходом с нижнего колебательного подуровня самого низкого из возбужденных синглетных состояний. Этот факт приводит к ряду важных следствий.

1. Спектры флуоресценции не должны зависеть от длины волны возбуждения.
2. Большинство или все спектры флуоресценции сдвинуты в область более низких энергий (в более длинноволновую область) относительно самой длинноволновой полосы поглощения.

3. При условии, что системы колебательных подуровней состояний S_b и S_a сходны, полоса флуоресценции будет близка по своей форме к зеркальному отражению самой длинноволновой полосы поглощения (рис. 8.12)

Из рис. 8.12 видно, что переходы между нулевыми колебательными подуровнями при поглощении [$S_a(v=0) \rightarrow S_b(v=0)$, линия 1] и флуоресценции [$S_b(v=0) \rightarrow S_a(v=0)$, линия 1'] должны происходить при одной и той же длине волны. В растворах обычно этого не наблюдается. Поглощение осуществляется так быстро, что окружение молекулы можно считать неизменным. Следовательно, переходу $S_a(v=0) \rightarrow S_b(v=0)$ соответствует разность энергий, при которой молекулы растворителя находятся в выгодной ориентации

относительно поглощающей молекулы в *основном состоянии*. Если после возбуждения молекулы растворителя успеют переориентироваться до момента излучения, то переходу $S_b(\nu = 0) \rightarrow S_a(\nu = 0)$ будет соответствовать разность энергий, при которой молекулы растворителя находятся в выгодной ориентации относительно молекулы в *возбужденном состоянии*. Эти разности совсем не обязательно должны быть одинаковыми, что приводит к сдвигу частоты $0 \leftrightarrow 0$ -переходов, называемому *стоксовым сдвигом*¹⁾.

МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЯ

На рис. 8.13 схематически изображена экспериментальная установка, обычно применяемая для измерения флуоресценции. Эксперимент можно проводить двумя способами. В первом случае при фиксированном положении монохроматора M_1 поворачивают монохроматор эмиссии M_2 и снимают спектр флуоресценции — зависимость интенсивности света, излучаемого молекулой в возбужденном синглетном состоянии, от длины волны. Во втором случае, напротив, фиксируют положение монохроматора M_2 и, поворачивая монохроматор M_1 , снимают спектр возбуждения. Поскольку система успевает перейти из всех состояний, лежащих по энергии в пределах и выше S_b , на основной колебательный подуровень состояния S_b еще до излучения, спектр возбуждения чистого вещества должен иметь ту же форму, что и спектр поглощения.

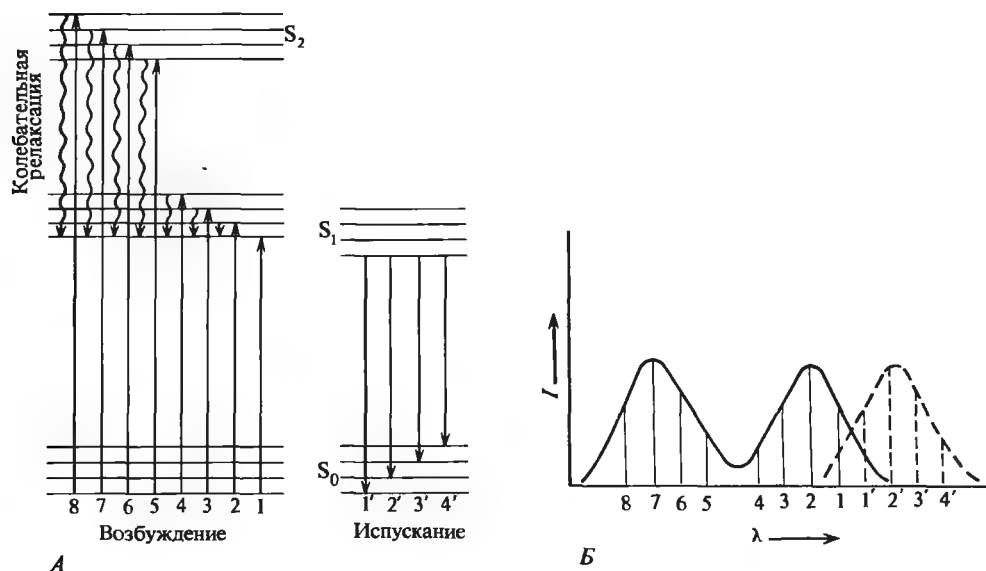
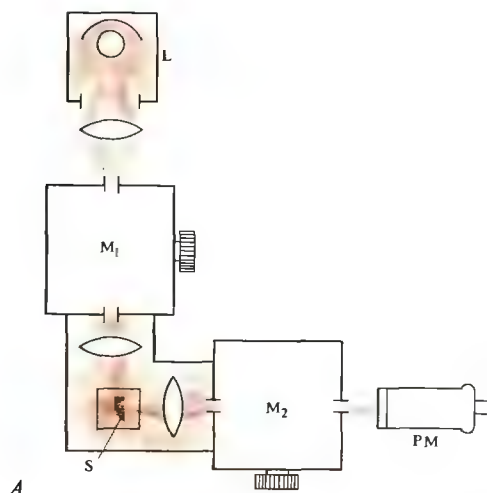


РИС. 8.12. Возбуждение и флуоресценция. А. Энергетические уровни. Б. Спектры. Заметим, что в результате безызлучательных переходов персход из S_2 в S_1 осуществляется гораздо быстрее, чем дезактивация с переходом из S_1 в основное состояние S_0 .

¹⁾ Обычно под *стоксовым сдвигом* понимают длинноволновый сдвиг максимума флуоресценции относительно максимума поглощения. — *Прим.ред.*



А



Б

РИС. 8.13. Измерение флуоресценции в стационарных условиях. А. Схематическое изображение флуоресцентного спектрометра. M_1 — монохроматор возбуждения, M_2 — монохроматор эмиссии, L — источник света, PM — фотоумножитель, S — образец. Б. Изображение кюветного отделения в увеличенном виде, иллюстрирующее эффект внутреннего фильтра.

При использовании простых однолучевых приборов типа представленного на рис. 8.13 спектры возбуждения и флуоресценции могут быть искажены. Искажение спектров возбуждения связано с неодинаковой интенсивностью излучения лампы при разных длинах волн, а искажение спектров флуоресценции обусловлено главным образом тем, что чувствительность детектора зависит от частоты света. Чтобы устранить эти искажения, потребовалось сконструировать гораздо более сложные спектрофлуориметры, чем схематически представленный на рис. 8.13, хотя принцип их действия остался прежним.

Величиной, чаще всего измеряемой при спектрофлуориметрических исследованиях, является квантовый выход ϕ_F — доля молекул в возбужденном синглетном состоянии, перешедших в основное состояние в результате флуоресценции. Абсолютное измерение ϕ_F , как это будет видно из дальнейшего, сопряжено с большими трудностями. Число возбужденных молекул при интенсивности падающего света I_0 пропорционально числу поглощенных квантов. Эту величину, согласно закону Ламберта—Бэра, можно найти, опреде-

лив при длине волны λ_b уменьшение интенсивности света. Запишем уравнение (7.33) в виде

$$I = I_0 e^{-2,303\varepsilon(\lambda_b)Cl}$$

где $\varepsilon(\lambda_b)$ — коэффициент экстинкции при длине волны возбуждения, C — концентрация поглощающих молекул, l — длина оптического пути. При низкой оптической плотности (это условие, как правило, выполняется при флуоресцентных исследованиях) данное выражение можно представить в виде

$$I = I_0 [1 - 2,303\varepsilon(\lambda_b)Cl]$$

Концентрация возбужденных молекул будет пропорциональна интенсивности поглощенного света:

$$I_0 - I = 2,303\varepsilon(\lambda_b)ClI_0$$

Интенсивность излучения молекулы при данной длине волны λ определяется произведением трех сомножителей: $\phi_F f(\lambda)d$, где ϕ_F — суммарная вероятность излучения, $f(\lambda)$ — доля светового потока, излучаемая при длине волны λ , d — доля светового потока при длине волны λ , реально попадающая на детектор.

Наблюдаемая в действительности интенсивность флуоресценции будет определяться произведением вероятностей поглощения и излучения:

$$F(\lambda) = 2,303\varepsilon(\lambda_b)ClI_0\phi_F f(\lambda)d = \varepsilon(\lambda_b)\phi_F f(\lambda)CI_0k \quad (8.42)$$

Мы объединили в одну константу коэффициенты пропорциональности и множители l и d , которые зависят от геометрии экспериментальной установки. Интегрирование уравнения (8.42) по λ дает величину, пропорциональную числу молекул, перешедших в возбужденное синглетное состояние. Но для определения квантового выхода ϕ_F нам нужно знать также абсолютную интенсивность возбуждающего света I_0 и константу k .

Чтобы обойти возникающие при этом трудности, измеряют относительный квантовый выход, используя для калибровки прибора стандартные соединения, например хинин-сульфат в 1 н. H_2SO_4 ($\phi_F = 0,70$) или флуоресцеин в 0,1 н. $NaOH$ ($\phi_F = 0,93$), и сравнивая интегральную интенсивность флуоресценции (8.42) образца и стандарта (концентрации подбираются таким образом, чтобы произведение εC в обоих случаях было одинаковым).

Другой подход к определению квантового выхода, основанный на использовании уравнения (8.41), состоит в измерении скорости затухания флуоресценции. Схема эксперимента выглядит следующим образом. Образец облучают коротким (~ 1 нс) импульсом света и следят за затуханием флуоресценции во времени. Интенсивность света $I(t)$, излучаемого в момент времени t после импульсного возбуждения, будет пропорциональна скорости инактивации синглетного возбужденного состояния и доле молекул в синглетном возбужденном состоянии, которые переходят в основное состояние в результате флуоресценции:

$$I(t) \propto \phi_F d(S_b)/dt = (S_b(0))(\phi_F/\tau_F)e^{-t/\tau_F} = k_F(S_b(0))e^{-t/\tau_F} \quad (8.43)$$

Здесь мы воспользовались выражением (8.39), чтобы найти $d(S_b)/dt$, и выражениями (8.35) и (8.41), чтобы исключить ϕ_F и τ_R . Хотя за кинетикой затухания можно следить непосредственно, обычно для этого используют косвенные методы. На рис. 8.14 показана типичная кривая, полученная методом подсчета одиночных фотонов. Четко видна простая экспоненциальная зависимость, описываемая уравнением (8.43).

Предположим, что образец содержит более одного флуоресцирующего компонента. Теперь спектр флуоресценции будет зависеть от длины волны возбуждения. Для смеси

двух компонентов (1 и 2)

$$F(\lambda) = [\varepsilon_1(\lambda_B)\phi_{1F}f_1(\lambda)C_1 + \varepsilon_2(\lambda_B)\phi_{2F}f_2(\lambda)C_2]I_0k \quad (8.44)$$

где все величины имеют тот же смысл, что и в уравнении (8.42). Точно так же спектр возбуждения не будет просто суммой двух спектров поглощения из-за наличия весовых множителей, зависящих от квантового выхода, и зависимости интенсивности флуоресценции каждого компонента, $f_1(\lambda)$ и $f_2(\lambda)$, от длины волны. Если спектры флуоресценции компонентов перекрываются, то затухание флуоресценции больше не будет описываться простой экспонентой:

$$I(t) = A_1e^{-t/\tau_{1F}} + A_2e^{-t/\tau_{2F}} \quad (8.45)$$

Амплитуды A_1 и A_2 будут пропорциональны концентрациям соответствующих компонентов.

Нельзя не обратить внимание на одно существенное различие между стационарными и кинетическими измерениями флуоресценции. Значение τ_F , определенное из уравнения (8.43), не зависит от концентрации, если мы имеем дело с единственным и чистым компонентом, *уравнение же (8.42) справедливо только для оптически тонких слоев* (поглощение при λ_B меньше чем 0,03). На практике при измерении зависимости интенсивности флу-

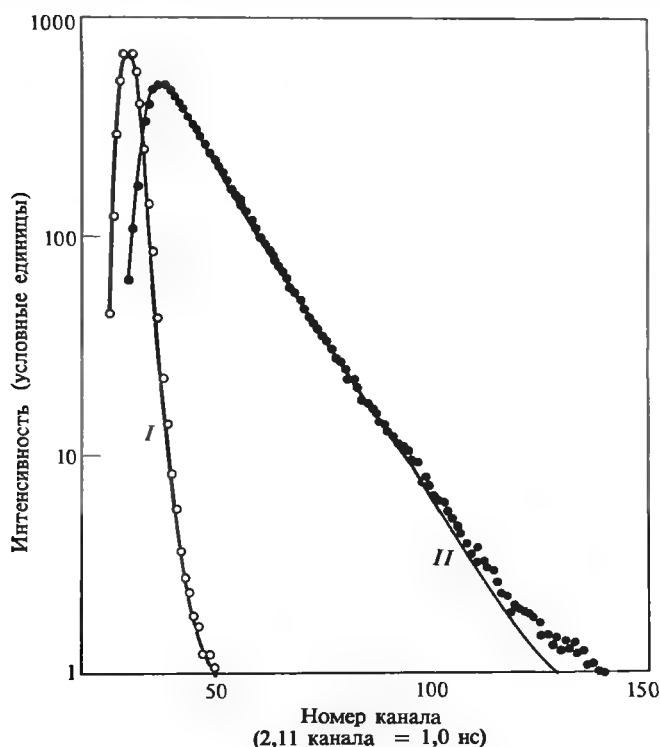


РИС. 8.14. Затухание флуоресценции основания Y, входящего в состав дрожжевой тРНК^{Phe}. Кривая I — возбуждающий импульс. Кривая II, проходящая через экспериментальные точки, построена теоретически, с учетом формы возбуждающего импульса и в предположении, что заселенность возбужденного синглетного состояния спадает по экспоненциальному закону с одним характерным временем $\tau_F = 6,2$ нс. (C.R.Cantor, T.Tao. In: Procedures in Nucleic Acid Research, vol. 2, New York, Harper and Row, 1971, p.31.)

оресценции от концентрации на приборе, аналогичном изображенному на рис. 8.13, при малых C интенсивность линейно зависит от концентрации, с увеличением C происходит насыщение и, наконец, при достаточно больших C $F(\lambda)$ начинает уменьшаться с ростом концентрации. Возникновение эффекта внутреннего фильтра схематически представлено на рис. 8.13,Б. Весь свет поглощается вблизи передней стенки кюветы, и большая часть потока излучения, исходящего из этой области, не попадает на выходную щель.

СВОЙСТВА ТИПИЧНЫХ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ ГРУПП

В табл. 8.2. представлены флуоресцентные характеристики хромофоров, присутствующих в белках и нуклеиновых кислотах. Для большинства из них характерны низкие квантовые выходы и малые времена жизни. Экспериментальная чувствительность, которая определяется произведением ϕ_F на $\epsilon_{\max}$ [уравнение (8.42.)], низка. Это далеко не идеальные образцы для экспериментальных измерений. На рис. 8.15 сравнивается флуоресценция типичных белков и свободных аминокислот. Спектр флуоресценции большинства белков определяется в основном флуоресценцией триптофана. Тирозин тоже мог бы давать существенный вклад во флуоресценцию, поскольку этот остаток, хотя и обладает более слабой флуоресценцией, обычно присутствует в белках в большом количестве. Однако вследствие переноса энергии на триптофан, о чем речь пойдет ниже, флуоресценция тирозиновых остатков, как правило, тушится.

Интенсивность флуоресценции обычных оснований нуклеиновых кислот очень мала, хотя некоторые минорные основания (например, основание Y) флуоресцируют достаточно сильно, что позволяет проводить рутинные измерения. Слабость собственной флуоресценции оснований поначалу обескураживала, но во многих случаях она обернулась благом. Один из подходов к решению подобной проблемы состоит в присоединении к системе флуоресцентной метки — интенсивно флуоресцирующего хромофора, который специфически связывается с исследуемым объектом или ковалентно присоединяется к нему.

Таблица 8.2.

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СОСТАВЛЯЮЩИХ БЕЛКОВ, НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И КОФЕРМЕНТОВ

Вещество	Условия	Поглощение			Флуоресценция ¹⁾		Чувствительность
		$\lambda_{\max}$, нм	$\epsilon_{\max} \times 10^{-3}$	$\lambda_{\max}$, нм	ϕ_F	τ_F , нс	
Триптофан	H ₂ O, pH 7	280	5,6	348	0,20	2,6	11
Тирозин	H ₂ O, pH 7	274	1,4	303	0,14	3,6	2,0
Фенилаланин	H ₂ O, pH 7	257	0,2	282	0,04	6,4	0,08
Основание Y	Дрожжевая tРНК ^{Phc}	320	1,3	460	0,07	6,3	0,91
Аденин	H ₂ O, pH 7	260	13,4	321	$2,6 \cdot 10^{-4}$	< 0,02	0,032
Гуанин	H ₂ O, pH 7	275	8,1	329	$3,0 \cdot 10^{-4}$	< 0,02	0,024
Цитозин	H ₂ O, pH 7	267	6,1	313	$0,8 \cdot 10^{-4}$	< 0,02	0,005
Урацил	H ₂ O, pH 7	260	9,5	308	$0,4 \cdot 10^{-4}$	< 0,02	0,004
NADH	H ₂ O, pH 7	340	6,2	470	0,019	0,40	1,2

¹⁾ Для ϕ_F приводятся максимальные из наблюдаемых значений. В каждом данном случае действительные значения могут быть существенно меньше.

Таблица 8.3

НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ МЕТКИ

Метка ¹⁾	Способ связывания	Поглощение		Испускание ²⁾			Чувствительность
		$\lambda_{\max}$, нм	$\varepsilon_{\max} \times 10^{-3}$	$\lambda_{\max}$, нм	ϕ_F	τ_F , нс	
Дансилхлорид	Ковалентно присоединяется к остаткам белков Lys и Cys	330	3,4	510	0,1	13	3,4
1,5-I-AEDANS	Ковалентно присоединяются к остаткам белков Lys и Cys	360	6,8	480	0,5	15	34
Флуоресцеин-изотиоцианат (FITC)	Ковалентно присоединяется к остатку белков Lys	495	42	516	0,3	4	116
8-анилино-1-нафтилсульфонат (ANS)	Нековалентно связывается с белками	374	6,8	454	0,98	16	67
Пирен и его производные	Применяются при поляризационных измерениях на больших системах	342	40	383	0,25	100	100
Этеноаденозин и его производные	Аналоги нуклеотидов, связывающиеся с белками и включающиеся в нуклеиновые кислоты	300	2,6	410	0,40	26	10
Бромистый этидий	Нековалентно связывается с нуклеиновыми кислотами	515	3,8	600	~ 1	26,5	38
Профлавинмо-носемикарбазид	Ковалентно присоединяется к 3'-концу РНК	445	15	516	0,02	—	30

¹⁾ Структурные формулы этих соединений приведены на рис. 8.16.

²⁾ Приведенные значения ϕ_F и τ_F являются максимальными из тех данных, которые были получены для биологических систем при комнатной температуре. Нередко наблюдаются и другие, заметно меньшие значения.

При специфическом включении метки можно получить разнообразную информацию о структуре. Обычно выбирают такую метку, чтобы возбуждающий свет поглощался только ею (но не макромолекулой). В этом случае макромолекула остается «невидимой», и вся информация относится к метке. В табл. 8.3 суммированы свойства нескольких наиболее часто используемых флуоресцентных меток (рис. 8.16). Заметим, что относительная экспериментальная чувствительность ($\varepsilon_{\max} \phi_F$), приведенная в таблице, значительно превышает соответствующую величину для большинства собственных хромофоров белков и нуклеиновых кислот.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХРОМОФОРА К ОКРУЖЕНИЮ

Флуоресценция, как правило, гораздо более чувствительна к окружению хромофора, чем поглощение, и это позволяет с успехом использовать ее для изучения связывания ли-

РИС. 8.15. Нормированные спектры флуоресценции, полученные при возбуждении светом с $\lambda = 240 - 250$ нм сывороточного альбумина человека (I), триптофана (II), смеси тирозина и триптофана в молярном отношении 18:1 (кривая III). Такое же соотношение между этими аминокислотами имеет место и в сыворточном альбумине. Отметим, что спектр этого белка очень напоминает спектр триптофана, если не считать, что последний сдвинут в сторону больших длин волн. (J.W. Longworth. In: Excited States of Proteins and Nucleic Acids ed. R.F. Steiner, I. Weinryb, New York, Plenum Press, 1971.)

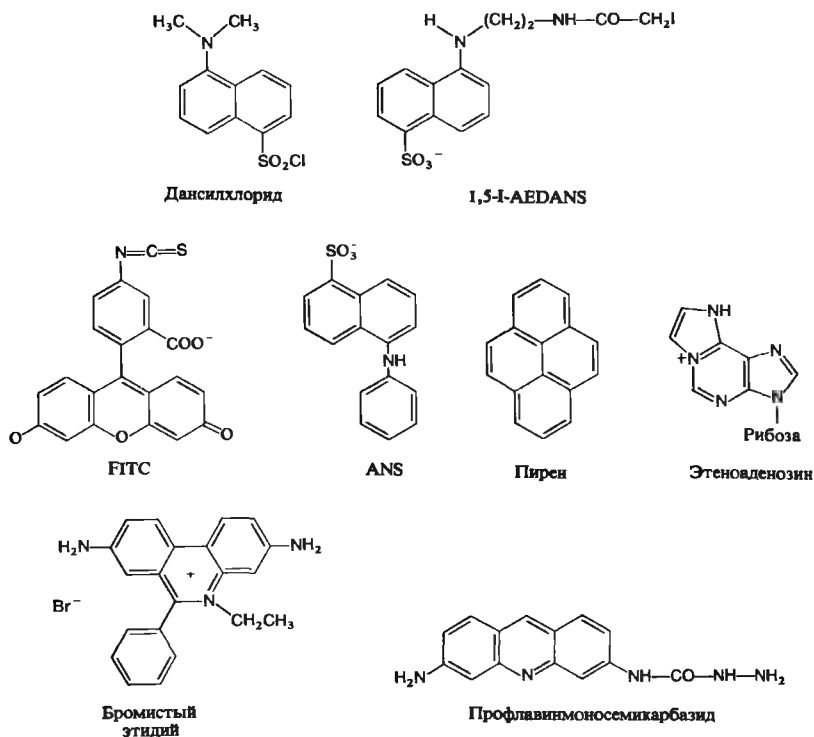
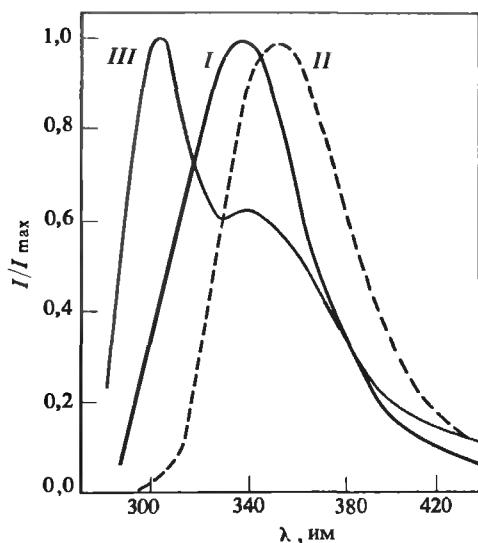


РИС. 8.16. Структурные формулы флуоресцентных меток, свойства которых описаны в табл. 8.3.

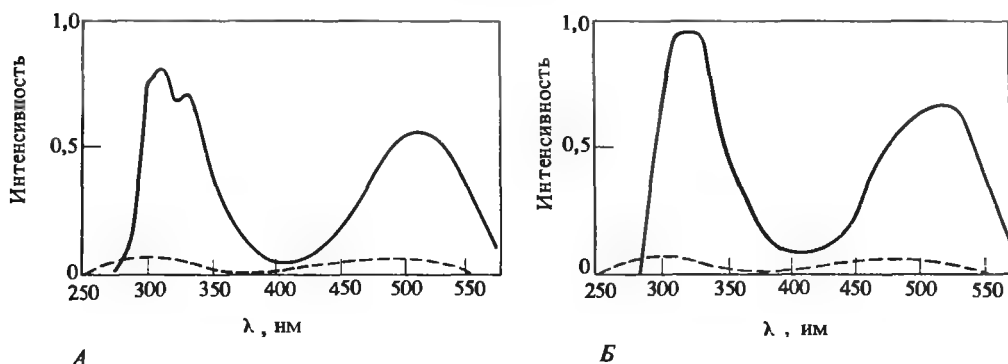


РИС. 8.17. Спектры возбуждения свободного бромистого этидия в водном растворе (штриховые кривые) и этого же красителя, связанного с двухцепочечной ДНК (А) и с РНК (Б) (сплошные кривые). Испускание регистрировалось при 600 нм. (По рисунку, предоставленному ЛеПеком и Паолетти.)

гандов или для выявления конформационных изменений. Более высокая чувствительность флуоресценции объясняется тем, что молекула довольно долго находится в возбужденном состоянии, прежде чем произойдет ее дезактивация. Поглощение совершается за время порядка 10^{-15} с (эти же времена характерны и для КД), и можно считать, что свойства молекулы и ее окружения не успевают измениться. Напротив, за время жизни синглетного возбужденного состояния, 10^{-9} – 10^{-8} с, могут произойти разные события — протонирование или депротонирование, релаксация окружающих молекул растворителя, локальные конформационные изменения и разнообразные процессы, связанные с поступательным и вращательным движением.

Целый ряд флуоресцирующих молекул обладает очень интересным свойством: в водных растворах наблюдается практически полное тушение их флуоресценции, зато в неполярном или жестком окружении интенсивность флуоресценции существенно возрастает (в 20 и более раз). Если флуоресцентная метка связывается с жестким или неполярным участком молекулы белка или нуклеиновой кислоты, то спектр флуоресценции определяется в основном меткой, находящейся в связанном состоянии. На рис. 8.17 приведен типичный пример такого рода. В случае белков среди меток, чувствительных к окружению, чаще всего используется краситель 8-анилинонафтилсульфонат, для нуклеиновых кислот такой меткой является этидий. В водных растворах этот краситель флуоресцирует очень слабо, но при встраивании в двухцепочечные участки нуклеиновых кислот интенсивность его флуоресценции резко возрастает. При фиксированной суммарной концентрации флуоресцентной метки изменение числа центров связывания или прочности связи приводит к существенным изменениям в наблюдаемой флуоресценции, что позволяет проводить прецизионные исследования разнообразных интересных явлений.

Еще одним аспектом влияния окружения на флуоресценцию хромофора является доступность последнего для молекул тушителя, находящихся в растворе. Основное состояние кислорода — триплетное. Столкновение его с молекулой, находящейся в возбужденном синглетном состоянии, приводит к увеличению вероятности синглет-триплетного перехода и, таким образом, к тушению флуоресценции. Аналогичное действие оказывают и тяжелые атомы (например, ионы цезия или иода), хотя механизм тушения здесь иной. Свободный хромофор в водном растворе очень чувствителен к такого рода тушению, а будучи связанным с макромолекулой, он может оказаться в значительной мере экранированным от растворителя, т.е. защищенным от молекул-тушителей. Измеряя зависимость

интенсивности флуоресценции от концентрации тушителя, в принципе можно различить остатки, находящиеся на поверхности белковой молекулы и внутри ее. Часто эти различия оказываются замаскированными из-за сложного влияния локального окружения. Например, анионные группы, находящиеся поблизости от хромофора, могут мешать отрицательно заряженным ионам тушителя (например, I^-) подойти достаточно близко к хромофору.

Чтобы проанализировать влияние тушителя, рассмотрим уравнения (8.35) и (8.36). Если сравнить интенсивность флуоресценции в присутствии (F) и в отсутствие (F_0) тушителя (или соответствующие квантовые выходы ϕ и ϕ_0) при заданных концентрации и геометрии образца, то мы получим

$$\begin{aligned} F_0/F = \phi_0/\phi &= [k_F + k_{ic} + k_{is} + k_q(Q)]/(k_F + k_{ic} + k_{is}) \\ &= 1 + k_q\tau_0(Q) \end{aligned} \quad (8.46)$$

где τ_0 — время жизни хромофора в возбужденном состоянии в отсутствие тушителя: $\tau_0 = (k_F + k_{ic} + k_{is})^{-1}$. Поскольку τ_0 можно измерить, из графика зависимости F_0/F от (Q) мы получим k_q . В табл. 8.4 приведены некоторые типичные значения констант бимолекулярного тушения. Константа тушения для свободного хромофора равна $\sim 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Такая большая скорость характерна для лимитируемых диффузией реакций. Для хромофоров, связанных с белковыми молекулами или входящих в их состав, k_q иногда оказывается существенно меньше.

СИНГЛЕТ-СИНГЛЕТНЫЙ ПЕРЕНОС ЭНЕРГИИ

Чрезвычайно интересным явлением, связанным с флуоресценцией, является способность хромофоров, достаточно удаленных от данного хромофора, находящегося в синглетном возбужденном состоянии, вызывать тушение его флуоресценции. В благоприятной ситуации это позволяет определить расстояние между хромофорами вплоть до 80 Å. Рассмотрим систему, содержащую только одну пару разных хромофоров, спектры которых приведены на рис. 8.18. Если эти хромофоры находятся на расстоянии нескольких ангстрем друг от друга, то, как мы уже знаем, они могут взаимодействовать по экс-

Таблица 8.4

ТУШЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ТРИПТОФАНА ПРИ СТОЛКНОВЕНИИ С МАЛЫМИ МОЛЕКУЛАМИ ¹⁾

Белок	Нативный белок (0,1 М фосфатный буфер, pH 7) $k_q \cdot 10^{-9} \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$		Денатурированный белок (добавлен 6 М гуанидин-хлорид) $k_q \cdot 10^{-9} \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	
	кислород	иод	кислород	иод
Триптофан	12,0	3,9	5,9	1,9
<i>n</i> -Ac—Try—NH ₂	11,6	3,8	7,3	2,1
Пепсин	5,7	1,7	4,3	1,8
Трипсиноген	4,3	0,3	6,1	1,2
Карбоксипептидаза А	3,8	0,3	3,8	1,1
Карбоангидраза	2,6	0,2	4,2	1,0

¹⁾ J.R. Lakowicz, G. Weber, Biochemistry, 12, 4171 (1973).

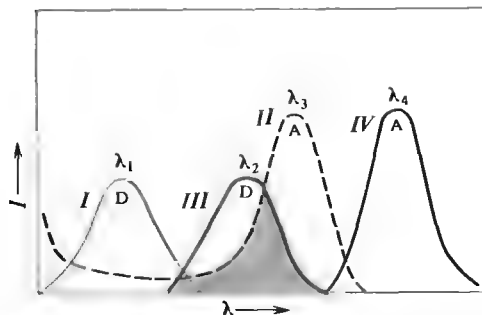


РИС. 8.18. Схематические спектры пары донор—акцептор, которая может быть использована при исследовании синглет-синглетного переноса энергии. Представлены спектры поглощения донора (I) и акцептора (II), а также спектры испускания донора (III) и акцептора (IV). Область перекрытия спектров (в пренебрежении множителем ν^{-4}) закрашена.

тонному механизму (связанные осцилляторы). Это взаимодействие приводит к расщеплению спектральных полос и их сдвигу. Однако нас интересует другая ситуация.

Между двумя хромофорами могут существовать взаимодействия, даже если эти хромофоры удалены друг от друга настолько, что никаких изменений в форме их спектров не наблюдается. В этом случае мы имеем дело с так называемыми слабыми взаимодействиями. Обозначим хромофор с более высокой энергией первого возбужденного синглетного состояния буквой D (донор), а хромофор с более низкой энергией — A (акцептор). Мы рассмотрим только основные (D_a , A_a) и первые возбужденные синглетные состояния (D_b , A_b) каждого хромофора. Предположим, что донор перешел в возбужденное состояние. Он будет очень быстро терять энергию возбуждения из-за внутренней конверсии, пока не достигнет основного колебательного уровня первого возбужденного синглетного состояния D_b . При совпадении энергии излучения донора с энергией поглощения акцептора даже очень слабое взаимодействие может привести к возникновению резонанса:



Как показано на рис. 8.19, сразу после переноса и донор, и акцептор находятся в возбужденных колебательных состояниях, но из-за колебательной релаксации быстро переходят на основной колебательный уровень. Следовательно, даже если константа скорости прямого переноса (k_T) очень велика, обратный перенос (k_{-T}) едва ли возможен. Резонансный перенос энергии изменяет относительную заселенность возбужденных уровней доноров и акцепторов. Возбуждение донора снимается, а акцептор переходит в возбужденное состояние и, следовательно, может флуоресцировать. Такое излучение акцептора называется сенсibilизированным. Заметим, что хромофоры не обязательно должны принадлежать одной и той же молекуле. Перенос энергии может происходить и между свободными молекулами в растворе, если их концентрация достаточно высока, чтобы среднее межмолекулярное расстояние было не более 50 Å.

Синглет-синглетный перенос энергии можно наблюдать несколькими способами. Определим эффективность переноса (E) как долю молекул донора D_b , которая дезактивируется путем передачи энергии акцептору:

$$E = k_T / (k_T + k_F^D + k_{ic}^D + k_{ic}^A) \quad (8.48)$$

Здесь k_T — константа скорости переноса, а все остальные константы относятся к процес-

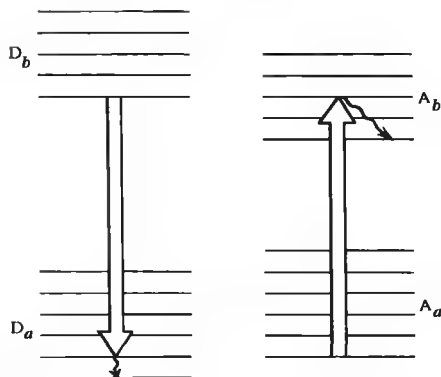


РИС. 8.19. Дезактивация донора и возбуждение акцептора, участвующих в резонансном взаимодействии, которое приводит к переносу энергии. Колебательная релаксация (волнистые стрелки) происходит очень быстро и предотвращает повторное взаимодействие, которое привело бы к дезактивации акцептора и повторному возбуждению донора.

сам, связанным с донором. Из рис. 8.18 видно, что если систему возбуждать при длине волны λ_1 , а флуоресценцию наблюдать при длине волны λ_2 , то мы будем регистрировать только флуоресценцию донора. Если приготовить два по возможности абсолютно идентичных образца, различающиеся только тем, что один содержит и донор, и акцептор, а другой — только донор, то E можно найти, сравнив параметры флуоресценции этих двух образцов. Используя уравнения (8.36) и (8.48), легко показать, что

$$\phi_{D+A}/\phi_D = [k_F^D/(k_F^D + k_{ic}^D + k_{is}^D + k_T)] \times [(k_F^D + k_{ic}^D + k_{is}^D)/k_F^D] = 1 - E \quad (8.49)$$

где ϕ_{D+A} — квантовый выход флуоресценции донора в присутствии акцептора.

Другой экспериментальный подход состоит в том, чтобы поддерживать длину волны флуоресценции постоянной (λ_4), а длину волны возбуждающего света менять от λ_3 до λ_1 . Если система содержит только акцептор, то спектр возбуждения будет близок к спектру поглощения акцептора, но если присутствует также и донор, то в спектре возбуждения появится дополнительный пик, соответствующий максимуму поглощения донора при длине волны λ_1 . Интенсивность этого пика будет зависеть от относительной эффективности поглощения донора и акцептора в окрестности λ_1 и от эффективности переноса энергии (E). При длине волны λ_4 можно наблюдать только флуоресценцию акцептора. Если геометрия экспериментальной установки и способ возбуждения неизменны, мы можем использовать для анализа результата формулу (8.42). Относительная флуоресценция образца, содержащего только акцептор (длина волны возбуждения равна λ_1 , флуоресценция регистрируется при длине волны λ_4), равна

$$F_A \propto \varepsilon_A C_A \phi_A \quad (8.50)$$

а для образца, содержащего и донор, и акцептор, она составит

$$F_{D+A} \propto \varepsilon_A C_A \phi_A + \varepsilon_D C_D E \phi_A \quad (8.51)$$

В формуле (8.51) $\varepsilon_D C_D$ пропорционально числу возбужденных молекул донора, E — это доля возбужденных молекул донора, передавших энергию акцептору. Объединяя результаты двух измерений, можно определить E :

$$F_{D+A}/F_A = 1 + (\varepsilon_D C_D / \varepsilon_A C_A) E \quad (8.52)$$

Третий, независимый способ определения E основан на сравнении времени затухания флуоресценции донора в присутствии ($\tau_{D,A}$) и в отсутствие (τ_D) акцептора. Можно показать (попробуйте проделать соответствующие выкладки сами), что

$$\tau_{D,A}/\tau_D = 1 - E \quad (8.53)$$

Определение эффективности переноса энергии путем прямого измерения времен жизни очень важно, так как на этой методике не сказывается наличие тривиальных процессов, которые имитируют перенос.

Требование, предъявляемое к резонансному взаимодействию, сопровождающемуся переносом энергии, состоит в том, чтобы спектр поглощения акцептора перекрывался со спектром флуоресценции донора (рис. 8.18). Следовательно, в любой системе, в которой происходит перенос энергии, может протекать процесс испускания фотона донором и перепоглощения его акцептором. Этот процесс отличается от истинного синглет-синглетного переноса энергии, так как при этом скорость излучения донора остается неизменной. Тривиальное испускание и перепоглощение фотонов выявляются при сравнении эффективностей переноса, полученных из уравнения (8.53), с одной стороны, и из уравнения (8.49) или (8.52) — с другой. Перепоглощение можно исключить, если работать с растворами, концентрация хромофора в которых не превышает 10^{-3} М.

ИЗМЕРЕНИЕ РАССТОЯНИЯ МЕЖДУ ХРОМОФОРАМИ ПО ДАННЫМ ОБ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ

Чтобы из данных по переносу энергии получить информацию о структуре, необходимо связать измеренную эффективность с расстоянием между двумя хромофорами. Такая связь была получена Т. Фёрстером, который рассчитал, что константа скорости переноса энергии равна

$$k_T = (1/\tau_D)(R_0/R)^6 \quad (8.54)$$

где τ_D — время жизни донора в возбужденном состоянии в отсутствие акцептора. Зависимость k_T от R^{-6} получается из-за возведения в квадрат матричного элемента оператора диполь-дипольного взаимодействия, который пропорционален R^{-3} (см. Дополнение 8.3). R_0 — так называемое характеристическое расстояние переноса, равное

$$R_0 = 9,7 \cdot 10^3 (J\kappa^2 n^{-4} \phi_D)^{1/6} \text{ см}, \quad (8.55)$$

где

$$J = \int \varepsilon_A(v) f_D(v) v^{-4} dv \quad (8.56)$$

J — это интеграл перекрывания спектра испускания донора и спектра поглощения акцептора (закрашенная область на рис. 8.18), f_D — нормированная интенсивность флуоресценции донора, которая входит в уравнение (8.42), n — показатель преломления среды, разделяющей донор и акцептор, ϕ_D — квантовый выход флуоресценции донора в отсутствие акцептора, κ^2 — множитель, связанный с геометрией системы, который зависит от ориентации донора и акцептора. Если и донор, и акцептор свободны и успевают много раз изменить свою ориентацию за время жизни возбужденного состояния, то κ^2 приближается к своему предельному значению, равному $2/3$. [Вывод выражений для величин, встречающихся в формулах (8.54)—(8.56), описан в Дополнении 8.3.]

Эффективность переноса можно найти, переписав формулы (8.48) в виде $E = k_T/(k_T + 1/\tau_D)$. Далее, подставляя k_T из формулы (8.54), получим

$$E = R_0^6/(R_0^6 + R^6) \quad (8.57)$$

На рис. 8.20 приведена теоретическая кривая зависимости E от R при заданном R_0 . Легко видеть, что, измеряя E , можно довольно точно определить расстояние, если оно не слишком отличается от R_0 . Для наиболее часто используемых пар хромофоров R_0 изменяется от 10 до 50 Å и более. Следовательно, этим методом можно измерять расстояния вплоть до ~ 80 Å.

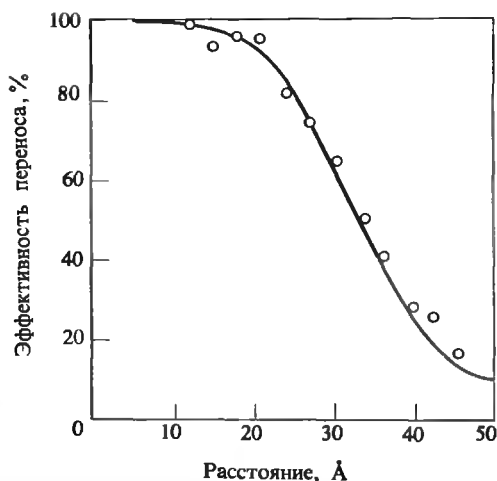
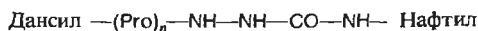


РИС. 8.20. Зависимость эффективности переноса энергии от расстояния для олигомера дансил-(L-пролил)- α -нафтилсемикарбазид; $n = 1 \div 12$. Подгонка кривой проведена с помощью уравнения (8.57). [L.Stryer, R.P.Haugland, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 719 (1967).]

Всесторонняя проверка теории Фёрстера проведена в работе Л. Страера и Р. Хогланда (L. Stryer, R. Haugland, 1967). Они приготовили серию меченных по концам молекул олигопептидов



Дополнение 8.3

СИНГЛЕТ-СИНГЛЕТНЫЙ ПЕРЕНОС ЭНЕРГИИ: ТЕОРИЯ ФЁРСТЕРА

Здесь мы дадим упрощенный вывод формул (8.54)—(8.56). Обратимся вначале к уравнению (7.27), из которого следует, что скорость возбуждения молекулы пропорциональна квадрату матричного элемента оператора взаимодействия, вызывающего возбуждение. Хотя мы вывели это уравнение для частного случая, оно является достаточно общим и часто называется золотым правилом Ферми. Нам нужно найти скорость, с которой пара хромофоров, D и A, переходит из состояния $\Psi_{Da} \Psi_{Ab}$ в $\Psi_{Db} \Psi_{Aa}$.

Рассмотрим вначале случай, когда переход $a \rightarrow b$ как для донора, так и для акцептора происходит при одной и той же частоте ν . Будем считать, что слабое взаимодействие между D и A представляет собой диполь-дипольное взаимодействие, такое же, как и использованное нами ранее для описания более сильных взаимодействий, приводящих к экситонному расщеплению. Тогда константа скорости переноса будет определяться следующим образом:

$$k_T(\nu) \propto |\langle \Psi_{Da} \Psi_{Ab} | \underline{V} | \Psi_{Db} \Psi_{Aa} \rangle|^2$$

где $\underline{V}$ по аналогии с (7.48) определяется как

$$\underline{V} = (\underline{\mu}_D \cdot \underline{\mu}_A) / R^3 - 3(\underline{\mu}_D \cdot \underline{R})(\underline{R} \cdot \underline{\mu}_A) / R^5$$

где $\underline{R}$ — расстояние между донором и акцептором, а $\underline{\mu}_D$ и $\underline{\mu}_A$ — операторы дипольного момента.

Поскольку оператор $\underline{\mu}_D$ зависит только от электронных координат донора, а оператор $\underline{\mu}_A$ — только от электронных координат акцептора, подстановка выражения для $\underline{V}$ в формулу для k_T дает

$$k_T(v) \propto (\kappa^2/R^6) |\langle \Psi_{D_a} | \underline{\mu}_D | \Psi_{D_b} \rangle|^2 |\langle \Psi_{A_b} | \underline{\mu}_A | \Psi_{A_a} \rangle|^2$$

Все величины, связанные с ориентацией D и A, объединены в этом выражении в один параметр κ . Мы видим, что константа скорости переноса обратно пропорциональна шестой степени расстояния. Член, содержащий $\underline{\mu}_A$, представляет собой силу диполя акцептора, которую, используя уравнение (7.40), можно в свою очередь выразить через интеграл по спектру поглощения. В случае, который мы рассматриваем, поглощение происходит только при одной частоте ν , и уравнение (7.40) имеет вид

$$|\langle \Psi_{A_b} | \underline{\mu}_A | \Psi_{A_a} \rangle|^2 \propto \epsilon_A \nu^{-1}$$

Член, содержащий $\underline{\mu}_D$, — это сила диполя донора, которую можно связать с константой скорости флуоресценции. Используя уравнения (8.32) и (8.34), получаем

$$D_{ab} \propto \nu^{-3} A_{ba} = \nu^{-3} \tau_R^{-1}$$

Поскольку, согласно уравнению (8.41), $\tau_R^{-1} = \phi_D / \tau_D$, где ϕ_D — квантовый выход флуоресценции донора в отсутствие акцептора, а τ_D — время жизни донора в возбужденном состоянии в отсутствие акцептора, то

$$|\langle \Psi_{D_a} | \underline{\mu}_D | \Psi_{D_b} \rangle|^2 \propto \nu^{-3} \phi_D / \tau_D$$

Используя все эти результаты, мы можем записать выражение для константы скорости переноса энергии в виде

$$k_T(v) \propto (\kappa^2/R^6) (\phi_D / \tau_D) \epsilon_A \nu^{-4}$$

Рассмотрим теперь общий случай, когда поглощение акцептора происходит в некотором интервале частот, так что ϵ_A является функцией ν . Аналогичным образом флуоресценция донора тоже наблюдается в некотором интервале частот. Пусть $f_D(\nu)$ — доля интенсивности флуоресценции донора при частоте ν . Суммарную константу скорости переноса энергии можно найти, если проинтегрировать константу скорости, ожидаемую для данной частоты:

$$k_T \propto (\kappa^2/R^6) (\phi_D / \tau_D) \int \epsilon_A(\nu) f_D(\nu) \nu^{-4} d\nu = (\kappa^2 \phi_D / R^6 \tau_D) J$$

Это выражение идентично формулам (8.54)—(8.56), за исключением числовых констант и того, что в этих формулах присутствует множитель n — показатель преломления. Наличие n связано с тем, что оператор $\underline{\mu}$ в том виде, как он был записан выше, применим только в вакууме; в прозрачной среде оператор взаимодействия в оптическом диапазоне частот равен $\underline{\mu}/n^2$.

Трудным моментом в теории Фёрстера является определение величины κ^2 . Считая, что взаимодействие между донором и акцептором не зависит от их ориентации, мы тем самым полагаем, что за время жизни возбужденного состояния донора ориентация становится хаотической. Это не всегда так. К сожалению, κ^2 нельзя измерить непосредственно. Из определения $\underline{\mu}$ мы знаем, что κ^2 лежит в интервале от 0 до 4. Для каждого частного случая можно сузить этот интервал, измеряя поляризацию флуоресценции, и тем не менее неопределенность в величине κ^2 до сих пор является главным источником ошибок при нахождении расстояния между хромофорами методом Фёрстера. К счастью, расстояние зависит только от $(\kappa^2)^{1/6}$; это легко показать, переписав (8.57) в виде

$$R = R_0 [(1 - E)/E]^{1/6}$$

Применяя формулы (8.55) и (8.56), удобно пользоваться спектрами, представленными в виде зависимости соответствующего параметра от длины волны, а расстояние выражать в ангстремах. Тогда (8.55) и (8.56) приобретают вид

$$R_0 = 8,79 \cdot 10^{-5} (J \kappa^2 n^{-4} \phi_D)^{1/6} \text{ \AA}$$

$$J = \int \epsilon_A(\lambda) f_D(\lambda) \lambda^4 d\lambda$$

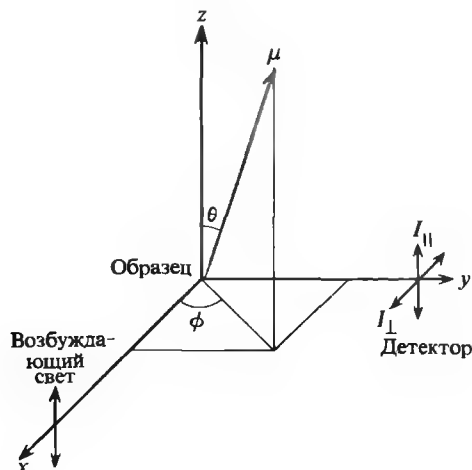


РИС. 8.21. Система координат, используемая при анализе явления поляризации флуоресценции.

Остатки пролина образуют полипролин со спиралью типа II, что подтверждается измерением КД. Поскольку расстояние между донором (нафтилом) и акцептором (дансилом) легко вычислить из известных размеров спирали, измеренные значения эффективности переноса можно непосредственно сравнивать с рассчитанными по теории Фёрстера; согласие теории с экспериментом оказалось великолепным (рис. 8.20). После этой пионерской работы перенос энергии был использован для определения расстояния между хромофорами в молекулах тРНК, иммуноглобулинах, родопсине и олигопептидах, а также между белковыми субъединицами в различных ассоциатах — от простых олигомерных белков до рибосом. Самое трудное в этих экспериментах — специфическое включение в исследуемую структуру двух флуоресцирующих хромофоров. Чтобы провести полный набор измерений, необходимо приготовить три образца. Они должны быть по возможности идентичными и различаться лишь тем, что один содержит только донор, другой — донор и акцептор, а третий — только акцептор.

Перенос энергии играет важную роль при анализе спектров флуоресценции обычных белков. Спектр флуоресценции тирозина перекрывается со спектром поглощения триптофана. Хотя R_0 для данной донорно-акцепторной пары составляет только $9 \text{ \AA}$, это все же сравнимо со средним расстоянием, ожидаемым для наиболее близко расположенных соседних пар тирозин-триптофан в глобулярных белках. Следствием этого является сильное тушение флуоресценции тирозина; почти вся наблюдаемая флуоресценция (как мы упоминали ранее) связана с триптофаном.

ПОЛЯРИЗОВАННАЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ

Информацию о размерах, форме и внутренней подвижности макромолекул можно получить, измеряя соответствующие параметры линейно поляризованных составляющих излучения образца, возбуждаемого плоскополяризованным светом. На рис. 8.21 приведена схема типичного поляризационного эксперимента. Свет падает вдоль оси x и регистрируется в направлении y . Падающий свет поляризован вдоль оси z . Измеряется интенсивность двух составляющих излучаемого света: $I_{||}$ — интенсивность составляющей, поляризованной вдоль оси z , и $I_{\perp}$ — интенсивность составляющей, поляризованной вдоль

оси x . Составляющая, которая распространялась бы вдоль оси y и одновременно была поляризована вдоль этой оси, отсутствует, поскольку световая волна, как и любые электромагнитные волны, является *поперечной*.

ПОЛЯРИЗАЦИЯ В ЖЕСТКИХ СИСТЕМАХ

Рассмотрим вначале жесткую изотропную систему; такой системой может быть, например, замороженный раствор флуоресцирующих молекул или хромофоры, жестко связанные с хаотически ориентированными молекулами столь большого размера, что за времена, характерные для флуоресценции (обычно < 100 нс), не происходит заметных молекулярных вращений. Обозначим через μ вектор момента перехода для поглощения ($\langle \Psi_b | \mu | \Psi_a \rangle$) одного хромофора в лабораторной системе координат. Вероятность того, что этот хромофор перейдет в возбужденное состояние, пропорциональна $(\mu \cdot E)^2$. Поскольку вектор E параллелен оси z , эта вероятность равна $\cos^2 \theta$, где θ — угол между μ и осью z . Следовательно, возбуждаться будут главным образом молекулы с моментами переходов, ориентированными преимущественно вдоль оси z . Это явление называется *фотоселекцией*.

Чтобы объяснить явление поляризации флуоресценции, нам необходимо вычислить вероятность возбуждения молекул с заданной ориентацией, а затем найти вероятность испускания ими света, поляризованного в заданном направлении. Воспользуемся сферической системой координат (рис. 8.21). До возбуждения относительное число молекул с μ , ориентированным в интервале углов от θ до $\theta + d\theta$ и от ϕ до $\phi + d\phi$, пропорционально $\sin \theta d\theta d\phi$. (Наличие множителя $\sin \theta$ связано с тем, что вероятность встретить молекулы, ориентированные перпендикулярно оси z , значительно больше, чем молекулы, ориентированные параллельно ей.) Как уже упоминалось, вероятность возбуждения молекулы, ориентированной под углами θ и ϕ , пропорциональна $\cos^2 \theta$. Следовательно, относительное число возбужденных молекул среди ориентированных в интервале от θ до $\theta + d\theta$ и от ϕ до $\phi + d\phi$ есть

$$P(\theta, \phi) d\theta d\phi \propto \cos^2 \theta \sin \theta d\theta d\phi \quad (8.58)$$

Доля возбужденных молекул с ориентацией в интервале от θ до $\theta + d\theta$ и от ϕ до $\phi + d\phi$ составляет

$$W(\theta, \phi) d\theta d\phi = P(\theta, \phi) d\theta d\phi / \int_0^\pi d\theta \int_0^{2\pi} d\phi \cos^2 \theta \sin \theta \quad (8.59)$$

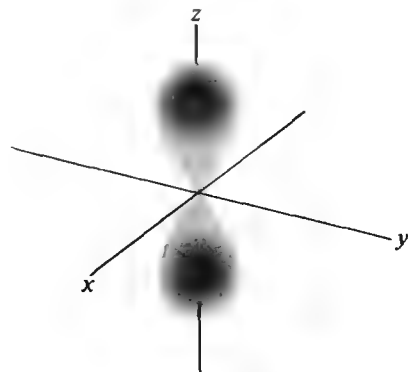
Интеграл, стоящий в знаменателе, представляет собой общее число возбужденных молекул. Его можно преобразовать при помощи подстановки $x = \cos \theta$, $dx = -\sin \theta$. В результате получим $4\pi/3$, так что уравнение (8.59) примет вид

$$W(\theta, \phi) d\theta d\phi = (3/4\pi) \cos^2 \theta \sin \theta d\theta d\phi \quad (8.60)$$

Заметим, что результат зависит только от θ . Распределение возбужденных молекул обладает цилиндрической симметрией относительно оси z . На рис. 8.22 дана наглядная картина этого распределения. Заметим, что моменты переходов возбужденных молекул ориентированы преимущественно вдоль оси z , а не x .

Поскольку распределение возбужденных молекул анизотропно, результирующее излучение также будет анизотропным. Для расчета нам необходимо знать относительные направления моментов перехода для поглощения и излучения в хромофоре. Если излучению

РИС. 8.22. Распределение возбужденных хромофоров при облучении образца светом, поляризованным вдоль оси z и распространяющимся вдоль оси x . Насыщенность серого цвета пропорциональна вероятности найти возбужденную молекулу с заданной ориентацией момента перехода.



и поглощению отвечает один и тот же переход (переход $S_a \rightarrow S_b$ сопровождается переходом $S_b \rightarrow S_a$), то моменты переходов для поглощения и излучения будут параллельны. Вероятность того, что излучение будет поляризовано вдоль оси z , пропорциональна $|\boldsymbol{\mu} \cdot \hat{\mathbf{k}}|^2$, где $\hat{\mathbf{k}}$ — единичный вектор, направленный вдоль оси z . Эта величина в свою очередь пропорциональна $\cos^2 \theta$. Чтобы найти относительную интенсивность излучения, поляризованного вдоль оси z , нужно умножить вероятность излучения на долю возбужденных молекул с заданной ориентацией $W(\theta, \phi)$ и произвести усреднение по всем ориентациям:

$$I_{\parallel} \propto \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^{\pi} d\theta \cos^2 \theta W(\theta, \phi) = (3/4)\pi \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^{\pi} d\theta \cos^4 \theta \sin \theta = 3/5 \quad (8.61)$$

Вероятность того, что излучение будет поляризовано вдоль оси x , пропорциональна $|\boldsymbol{\mu} \cdot \hat{\mathbf{i}}|^2$, где $\hat{\mathbf{i}}$ — единичный вектор, направленный вдоль оси x . Эта величина пропорциональна $(\sin \theta \cos \phi)^2$. Чтобы найти относительную интенсивность излучения $I_{\perp}$, вновь усредним вероятности излучения по всевозможным ориентациям возбужденных молекул:

$$I_{\perp} \propto \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^{\pi} d\theta \sin^2 \theta \cos^2 \phi W(\theta, \phi) = (3/4)\pi \int_0^{2\pi} d\phi \cos^2 \phi \int_0^{\pi} d\theta \cos^2 \theta \sin^3 \theta = 1/5 \quad (8.62)$$

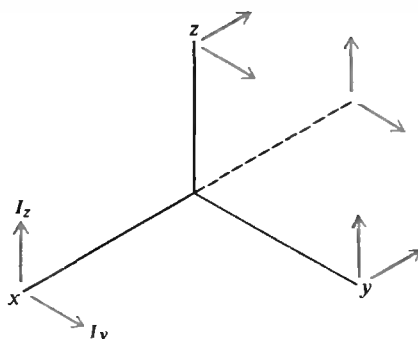
На практике измеряют $I_{\parallel}$ и $I_{\perp}$ и сравнивают их между собой. Для удобства сравнения вводят две величины, степень поляризации P и степень анизотропии A (см. также Дополнение 8.4):

$$P = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp}) \quad A = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp}) \quad (8.63)$$

Подставляя (8.61) и (8.62) в соотношение (8.63), получаем, что для только что описанных совершенно жестких систем $P = 1/2$, $A = 2/5$. Это максимально возможные значения степени поляризации и степени анизотропии при любых условиях.

ПОЛЯРИЗАЦИЯ И АНИЗОТРОПИЯ

Степень поляризации и анизотропии — не столь произвольные величины, как это может показаться на первый взгляд. P определяется по аналогии с дихроичным отношением [см. уравнение (7.42)], и ее довольно просто измерить. Величина A чаще используется при анализе экспериментальных данных, полученных для сложных систем. Знаменатель в выражении для этой величины представляет собой суммарную интенсивность света, которая наблюдалась бы в отсутствие поляризаторов (см. рисунок). Неполяризованный свет, распространяющийся вдоль оси x , можно разложить на



составляющие, поляризованные вдоль осей y и z . Чтобы найти суммарную интенсивность, нужно сложить интенсивности составляющих вдоль всех трех декартовых координат. Для света, поляризованного вдоль оси z , имеются две взаимно перпендикулярные составляющие, распространяющиеся вдоль оси z , а также одна параллельная и одна перпендикулярная, распространяющиеся вдоль осей x и y . Для света, поляризованного вдоль оси y , имеются две перпендикулярные составляющие, распространяющиеся вдоль оси y , и, кроме того, одна параллельная и одна перпендикулярная составляющие, распространяющиеся вдоль осей x и z . В результате мы имеем $8I_{\perp}$ и $4I_{\parallel}$. Следовательно, суммарное излучение имеет вдвое больше перпендикулярных составляющих, чем параллельных.

Пользоваться степенью анизотропии во многих отношениях удобнее, чем степенью поляризации. В частности, уравнения, куда входит эта величина, проще соответствующих уравнений, в которых фигурирует степень поляризации. Другое преимущество выявляется при анализе смесей. Суммарная анизотропия многокомпонентных смесей веществ с одинаковой интенсивностью флуоресценции, но разной степенью анизотропии A_i равна $\sum_i x_i A_i$, где x_i — мольная доля компонента. Для степени поляризации такое простое соотношение не выполняется. Следует помнить, однако, что одну из этих величин можно заменить другой с помощью формулы

$$[(1/P) - (1/3)]^{-1} = 3A/2$$

которую легко вывести из соотношения (8.63).

Другой распространенный случай — это система, в которой моменты переходов для излучения и поглощения взаимно перпендикулярны. Такая ситуация наблюдается во мно-

гих плоских хромофорах, когда поглощение света приводит к переходу молекулы на второй синглетный уровень, а излучение наблюдается при переходе с первого синглетного уровня. В этом случае для жестких систем $P = -1/2$, $A = -1/2$. Эти значения можно получить в результате операций усреднения, аналогичных описанным выше.

Значения степени поляризации и степени анизотропии для жестких систем — это предельные значения, они обозначаются P_0 и A_0 соответственно. В общем случае

$$P_0 = (3 \cos^2 \xi - 1)/(\cos^2 \xi + 3) \quad A_0 = (3 \cos^2 \xi - 1)/5 \quad (8.64)$$

где ξ — угол между моментами переходов для поглощения и излучения. С помощью этих выражений можно найти угол ξ для жестких систем.

Рассмотрим теперь другой предельный случай, при котором хромофоры вращаются настолько быстро, что за время жизни возбужденного состояния их ориентация становится хаотической. В этом случае всякая память о первоначальной селекции теряется еще до того, как произойдет излучение. $I_{\parallel} = I_{\perp}$, и как степень поляризации, так и степень анизотропии равны нулю.

● ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДВИЖЕНИЯ

Свойства большинства макромолекул, представляющих биологический интерес, оказываются промежуточными между двумя описанными выше предельными ситуациями: нельзя считать, что за время жизни возбужденного состояния их ориентация не изменяется, и в то же время вращение осуществляется не настолько быстро, чтобы ориентация за это время стала хаотической. Предположим, что флуоресцентная метка жестко связана с макромолекулой. Наблюдаемая степень поляризации примет некоторое промежуточное значение между тем, которое следует из соотношения (8.64), и нулем. Чтобы найти это значение, нужно проанализировать относительные скорости излучения и вращательного движения макромолекулы. Заметим, что поступательное движение не влияет на поляризацию флуоресценции. Этим методом можно выявить только движение, которое изменяет ориентацию моментов переходов.

Рассмотрим вначале, что произойдет при возбуждении молекул образца импульсом поляризованного света; проследим за изменением $I_{\parallel}$ и $I_{\perp}$ во времени. Если поглощающий и излучающий диполи параллельны, то самые первые из испускаемых фотонов, скорее всего, будут поляризованы вдоль оси z , поскольку молекулы не могли так быстро переориентироваться. Последние испускаемые фотоны должны быть поляризованы хаотически, поскольку за это время система успела повернуться на значительный угол. Следовательно, степень поляризации и степень анизотропии будут изменяться от начальных значений P_0 и A_0 до нуля. Скорость, с которой будут спадать эти величины, является мерой скорости вращательного движения.

Вращательное броуновское движение описывается уравнением диффузии, совершенно аналогичным уравнению для поступательного движения¹⁾. Пусть $W(\theta, \phi, t)$ — это приведенная к единичному интервалу θ и ϕ вероятность для сферической молекулы иметь ориентацию θ, ϕ в момент времени t ; тогда

$$dW(\theta, \phi, t)/dt = D_{\text{вр}} \nabla^2 W(\theta, \phi, t) \quad (8.65)$$

¹⁾ Читатель, ие очень хорошо знакомый с уравнениями диффузии, может для лучшего понимания смысла уравнения (8.65) и некоторых его свойств прочитать разд. 10.3 и 12.2.

$D_{\text{вр}}$ (коэффициент вращательной диффузии) связан с коэффициентом вращательного трения ($f_{\text{вр}}$) соотношением

$$D_{\text{вр}} = kT/f_{\text{вр}} = kT/6V_{\text{гидр}}\eta \quad (8.66)$$

где $V_{\text{гидр}}$ — объем гидратированной молекулы, T — абсолютная температура, η — вязкость раствора.

$W(\theta, \phi, t)$ — это вероятность для любой молекулы иметь определенную ориентацию в момент времени t . Однако в поляризационных измерениях мы наблюдаем только за теми молекулами, которые были возбуждены при $t = 0$. Используя уравнение (8.60), мы можем представить исходное распределение возбужденных молекул в виде

$$W(\theta, \phi, 0) = (3/4\pi) \cos^2 \theta \sin \phi \quad (8.67)$$

Решение уравнения (8.65) с использованием этого начального условия приводит к точному выражению для $W(\theta, \phi, t)$. Это выражение является функцией только что введенного коэффициента вращательной диффузии и дает угловое распределение моментов перехода для поглощения в любой момент времени t .

Заселенность синглетного возбужденного уровня, на который перешли молекулы в момент времени $t = 0$, уменьшается в соответствии с уравнением (8.39). Следовательно, распределение молекул, которые в момент времени t все еще находятся в возбужденном состоянии, определяется следующим образом:

$$W(\theta, \phi, t)e^{-t/\tau_F} \quad (8.68)$$

Как отмечалось выше, при параллельной ориентации поглощающих и излучающих диполей вероятности того, что возбужденная молекула, ориентированная под углом θ и ϕ , испустит фотоны, поляризованные вдоль осей z или x (P_z и P_x), пропорциональны соответственно $\cos^2 \theta$ и $\sin^2 \theta \cos^2 \phi$. В более общем случае вероятность излучения вдоль некоторой заданной оси является также функцией угла ξ между поглощающим и излучающим диполями. Эту вероятность можно записать в виде $P_a(\theta, \phi, \xi)$, где индекс a относится к оси, вдоль которой поляризована данная составляющая.

Объединив величины $P_a(\theta, \phi, \xi)$ и $W(\theta, \phi, t)e^{-t/\tau_F}$, мы получим вероятность того, что возбужденная в нулевой момент времени молекула в момент времени t испустит фотон, поляризованный вдоль оси a . Интегрирование этого выражения по всем ориентациям дает ожидаемую интенсивность излучения, поляризованного вдоль оси a , как функцию времени:

$$I_a(t) = \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^\pi d\theta P_a(\theta, \phi, \xi) W(\theta, \phi, t) e^{-t/\tau_F} \quad (8.69)$$

Этот интеграл можно вычислить, используя точные выражения для P_a и W . Для составляющих, поляризованных в параллельном и перпендикулярном направлениях, имеем

$$I_{\parallel}(t) = [(1/3) + (4/15)e^{-6D_{\text{вр}}t}(3 \cos^2 \xi - 1)/2]e^{-t/\tau_F} \quad (8.70)$$

$$I_{\perp}(t) = [(1/3) - (2/15)e^{-6D_{\text{вр}}t}(3 \cos^2 \xi - 1)/2]e^{-t/\tau_F} \quad (8.71)$$

Таким образом, хотя неполяризованное излучение затухает как одна экспонента, каждая из поляризованных компонент затухает как сумма двух экспонент. Если подставить (8.70) и (8.71) в выражение для степени анизотропии флуоресценции $A(t)$, то мы получим особенно простой результат:

$$A(t) = [I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)]/[I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)] = (2/5)e^{-6D_{\text{вр}}t} [(3 \cos^2 \xi - 1)/2] \quad (8.72)$$

Определим время вращательной корреляции τ_c как

$$\tau_c = 1/6D_{\text{вр}} = V_{\text{гидр}}\eta / kT \quad (8.73)$$

Тогда

$$A(t) = (2/5)e^{-t/\tau_c}[(3 \cos^2 \xi - 1)/2]$$

Заметим, что в пределе при $t \rightarrow 0$ (8.72) переходит в (8.64).

Таким образом, степень анизотропии флуоресценции сферической молекулы спадает по простому экспоненциальному закону. Измерение характерного времени спада τ_c позволяет при известной вязкости рассчитать объем гидратированной молекулы $V_{\text{гидр}}$. Из уравнения (8.73) видно, что чем больше молекула, тем медленнее спадает степень анизотропии флуоресценции. Это довольно очевидный результат, поскольку чем больше молекула, тем медленнее она вращается. На рис. 8.23 приведены данные по уменьшению степени анизотропии для антранилоилхимотрипсина. Измеренное время вращательной корреляции равно 15 нс. Это — типичное значение для небольших белков.

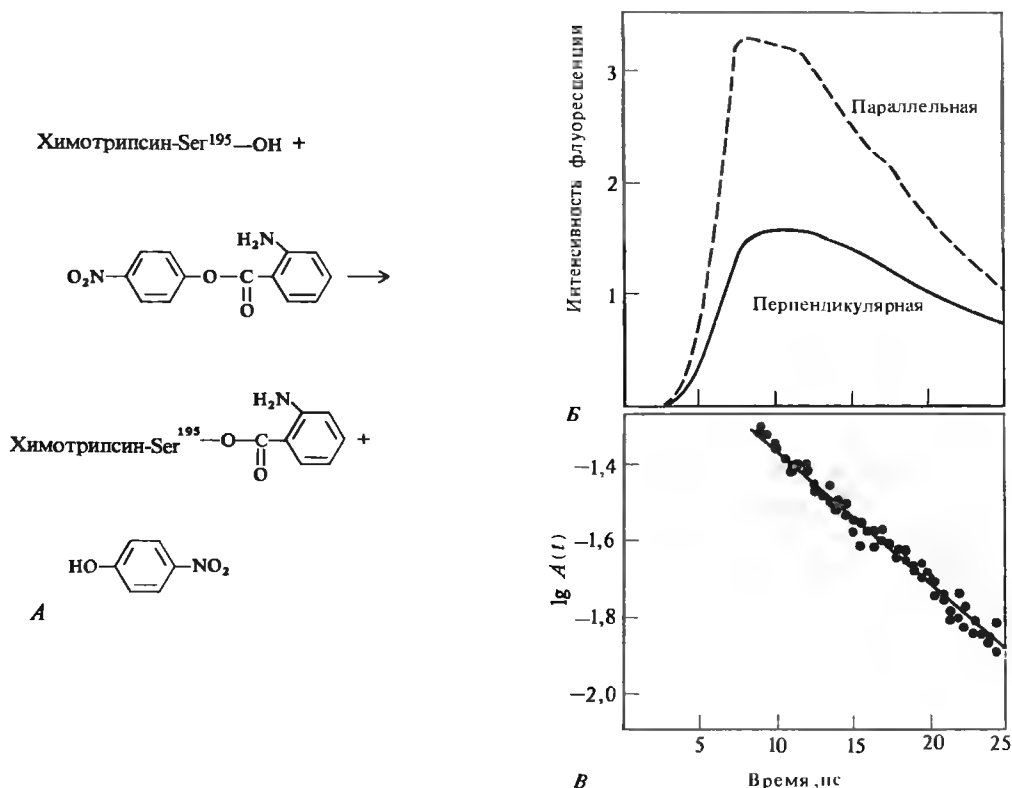


РИС. 8.23. Спад анизотропии флуоресценции антранилоила, ковалентно присоединенного к Ser¹⁹⁵ α -химотрипсина. А. Получение меченого белка. Б. Экспериментальные данные по спаду интенсивности флуоресценции отдельных поляризованных составляющих. В. График зависимости логарифма анизотропии, полученный после математической обработки (свертки) экспериментальных данных, которая позволяет исключить влияние формы возбуждающего импульса. [L.Stryer, Science, 162, 526 (1968).]

Если молекулярная масса и удельный парциальный объем вещества известны, из уравнения (10.10) можно найти $V_{\text{гидр}}$. Удельный объем типичных гидратированных белковых молекул равен примерно $1 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$. Следовательно, объем одной гидратированной молекулы составит $M/N_0 = (M/6) \cdot 10^{-23} \text{ см}^3$. Вязкость воды при 20°C приблизительно равна $0,01$ пуаза, $T = 293 \text{ К}$, $k = 1,38 \cdot 10^{-16} \text{ эрг} \cdot \text{град}^{-1}$. Таким образом, τ_c в соответствии с формулой (8.73) составляет

$$\tau_c = (0,01 \cdot M \cdot 10^{-23}) / (6 \cdot 293 \cdot 1,38 \cdot 10^{-16}) = (M/2,4) \cdot 10^{-12} \text{ с} \quad (8.74)$$

τ_c примерно равно 1 нс на каждые 2400 дальтон молекулярной массы белка, если молекула имеет приблизительно сферическую форму. [Уравнение (8.74) справедливо также для глобулярных нуклеиновых кислот.] В эксперименте, результаты которого приведены на рис. 8.23, мол. масса белка равна $25\,000$, следовательно, τ_c должно составлять 10 нс . Различие между расчетным и экспериментальным значениями скорости связано с тем, что по своей форме молекула химотрипсина отличается от сферы. Частицы, имеющие вытянутую форму, вращаются медленнее (см. гл. 10).

Чаше, однако, измеряют не характерное время спада, а среднюю интенсивность параллельно и перпендикулярно поляризованных составляющих:

$$\bar{I}_{\parallel} = \tau_F^{-1} \int_0^{\infty} I_{\parallel}(t) dt \quad \bar{I}_{\perp} = \tau_F^{-1} \int_0^{\infty} I_{\perp}(t) dt \quad (8.75)$$

Эти средние значения интенсивностей наблюдаются при непрерывном облучении. Полученные в таких опытах значения степени поляризации и анизотропии называются статическими или стационарными. Чтобы найти их, подставим (8.70) и (8.71) в соотношение (8.75):

$$\bar{P} = \frac{\bar{I}_{\parallel} - \bar{I}_{\perp}}{\bar{I}_{\parallel} + \bar{I}_{\perp}} = \frac{3}{1 + 10(1 + \tau_F/\tau_c)(3 \cos^2 \xi - 1)^{-1}} \quad (8.76)$$

$$\bar{A} = \frac{\bar{I}_{\parallel} - \bar{I}_{\perp}}{\bar{I}_{\parallel} + 2\bar{I}_{\perp}} = \frac{3 \cos^2 \xi - 1}{5(1 + \tau_F/\tau_c)} \quad (8.77)$$

Предположим, что измерения проводятся при столь высоких значениях η/T , что за время жизни возбужденного состояния макромолекула не успевает изменить ориентацию. В этом случае $\tau_F/\tau_c = 0$, и степень поляризации и анизотропия равна

$$\bar{P}_0 = 3/[1 + 10(3 \cos^2 \xi - 1)^{-1}] = (3 \cos^2 \xi - 1)/(\cos^2 \xi + 3) \quad (8.78)$$

$$\bar{A}_0 = (3 \cos^2 \xi - 1)/5 \quad (8.79)$$

Эти выражения, дающие предельные значения степени поляризации и анизотропии, идентичны выражениям (8.64) для жестких систем.

УРАВНЕНИЯ ПЕРРЕНА

И ИЗМЕРЕНИЕ СТАЦИОНАРНОЙ СТЕПЕНИ ПОЛЯРИЗАЦИИ

Используя выражения (8.78) и (8.79), мы можем переписать уравнения (8.76) и (8.77) в очень удобной форме:

$$1/\bar{P} - 1/3 = (1/\bar{P}_0 - 1/3)(1 + \tau_F/\tau_c) = (1/\bar{P}_0 - 1/3)(1 + \tau_F k T / V_{\text{гидр}} \eta) \quad (8.80)$$

$$A^{-1} = \bar{A}_0^{-1}(1 + \tau_F/\tau_c) = \bar{A}_0^{-1}(1 + \tau_F k T / V_{\text{гидр}} \eta) \quad (8.81)$$

Это так называемые уравнения Перрена. При подстановке выражения для времени вращательной корреляции (τ_c) использовано уравнение (8.73). Именно эти выражения для степени поляризации и анизотропии чаще всего применяются на практике. При этом исследуют зависимость стационарной поляризации или анизотропии раствора макромолекул от температуры T или вязкости η . При графической обработке данных, проводимой в соответствии с уравнениями (8.80) и (8.81), должна получиться прямая, из наклона которой находят молекулярный объем ($V_{\text{гидр}}$) при условии, что известно время затухания флуоресценции (τ_F). Пересечение прямой с осью ординат при $T/\eta \rightarrow 0$ дает предельную анизотропию или поляризацию. На рис. 8.24 приведен соответствующий график для химотрипсина. Предельное значение степени анизотропии ($=0,3$) свидетельствует о практически жестком закреплении флуоресцентной метки. Время вращательной корреляции (15 нс) согласуется со значением, полученным из данных по измерению зависимости спада степени анизотропии от времени. Экспериментально найденное значение достаточно близко к теоретическому, оцененному ранее для жесткой сферической белковой молекулы.

Уравнения (8.65)—(8.81) справедливы только для сферических молекул. Если последние по своей форме ближе к жесткому эллипсоиду, а не к сфере, результаты существенно усложняются. Коэффициент вращательной диффузии, входящий в уравнение (8.65), теперь становится тензором. Спад анизотропии флуоресценции описывается не уравнением (8.72) с одной экспонентой, а выражением, содержащим сумму до пяти экспонент. Эти экспоненты зависят не только от размеров и формы молекул, но также от ориентации моментов переходов хромофоров относительно осей эллипсоида. В принципе при наличии достаточно точных данных о зависимости спада степени анизотропии от времени можно было бы получить весьма полное представление о форме молекулы и способе связывания с ней хромофора. На практике попытки описать полученные данные при помощи более чем двух экспонент обычно оказываются превышением точности эксперимента. В таком случае единственный выход состоит в построении более или менее правдоподобных моделей, удовлетворяющих данной структуре, и в установлении степени их соответствия экспериментальным данным. Одно можно утверждать несомненно: для вытянутого эллипсоида кажущееся τ_c больше, чем для сферы. Следовательно, если известна молекулярная масса, как правило, можно получить некоторую информацию об отношении осей.

Может оказаться, что полученное значение степени анизотропии меньше, чем теоретически рассчитанное для сферической молекулы известной молекулярной массы. Это обстоятельство указывает на гибкость макромолекулы как целого или на нежесткое присоединение хромофора к макромолекуле. Иногда эти эффекты можно различить, если провести поляризационные измерения при высоких значениях T/η . $V_{\text{гидр}}$ хромофора составляет приблизительно 1% или меньше от объема типичной макромолекулы. Если хромофор свободно сочленен с макромолекулой, его время вращательной корреляции будет составлять примерно $1/100$ от соответствующего времени для макромолекулы. При низкой вязкости за небольшой по сравнению с характерным временем затухания флуоресценции период времени хромофор успевает принять все возможные ориентации. Если угол, на который поворачивается хромофор, достаточно велик, наблюдаемая поляризация будет равна нулю. Если, однако, быстрое движение хромофора происходит в ограниченном диапазоне углов вращения, некоторая остаточная поляризация все же будет наблюдаться. Чтобы хромофор смог принять все возможные ориентации, он должен участвовать в движении макромолекулы как целого. Таким образом, при низкой вязкости зависимость остаточной поляризации от T/η будет отражать движение макромолекулы. Экстраполяция графика зависимости P^{-1} от T/η к $T/\eta \rightarrow 0$ позволяет найти конус углов, в котором происходит быстрое движение хромофора.

При достаточно большой вязкости макромолекула становится неподвижной. Хромофор все еще имеет некую свободу движения, и это будет проявляться в виде более сильной

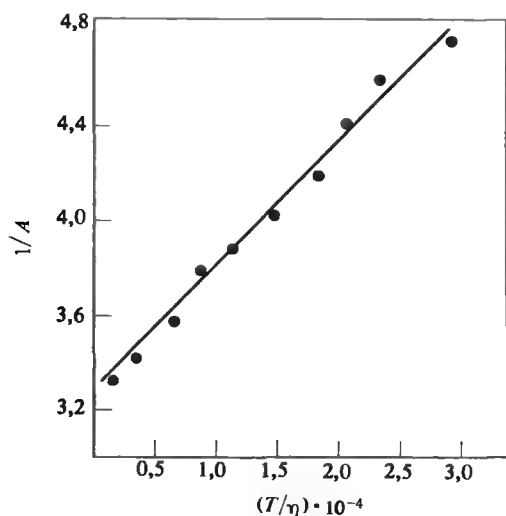


РИС. 8.24. Статическая поляризация флуоресценции антранилоил-Ser¹⁹⁵-α-химотрипсина (см. рис. 8.23). Данные для этого графика Перрена получены при постоянной температуре 20°C; вязкость изменяли добавлением к водным белковым растворам глицирина. (R.P.Haugland, L.Stryer. In: Conformation Biopolymers, vol.1, ed. G.N.Ramachandran, New York, Academic Press, 1967.)



РИС. 8.25. Зависимость степени анизотропии от температуры или вязкости в координатах Перрена для образца, в котором флуоресцентная метка, связанная с макромолекулой, обладает ограниченной свободой вращения. Экстраполяция линейного участка графика к $T/\eta = 0$ (штриховая прямая) дает кажущееся значение A_0 , существенно меньшее, чем истинное значение. Различие между этими двумя значениями служит мерой интервала значений углов, в пределах которого происходит вращение метки относительно макромолекулы.

зависимости поляризации от T/η при больших η . В результате получится нелинейный график Перрена (см. рис. 8.25). Таким образом, поляризация может четко указывать на гибкость либо тех участков молекулы, где находится место связывания хромофора, либо макромолекулы как целого. Это важная информация, которую часто очень трудно получить при помощи гидродинамических методов измерения поступательного движения, таких, например, как седиментация.

Помимо анализа молекулярного движения поляризационные исследования могут использоваться также для обнаружения синглет-синглетного переноса энергии. Предположим, что белок или нуклеиновая кислота содержат два или более идентичных флуоресцирующих хромофора. При возбуждении одного из них может произойти передача энергии на другой хромофор еще до испускания. Если хромофоры не параллельны, то излучающий диполь уже не будет параллелен поглощающему. Согласно уравнению (8.64), степень поляризации системы изменится. Если спектры флуоресценции хромофоров сдвинуты да-

леко в красную область относительно их спектров поглощения, это изменение, вероятно, будет мало из-за слабого перекрытия спектров, и, следовательно, малого R_0 . Но у многих хромофоров спектры флуоресценции и поглощения в значительной степени перекрываются. В таких случаях измерение степени поляризации является эффективным методом определения расстояния между хромофорами. Однако, если эффективность переноса энергии велика, это серьезно усложняет поляризационный анализ размеров и формы макромолекул.

8.3. Инфракрасная спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния

Переходам между колебательными уровнями основного электронного состояния соответствует значительно меньшая энергия, чем электронным переходам. Полосы поглощения, отвечающие колебательным переходам, обычно лежат в интервале от $5\,000\text{ см}^{-1}$ ($= 2\text{ мкм} = 2\,000\text{ нм}$) до 200 см^{-1} ($= 50\text{ мкм} = 50\,000\text{ нм}$). Колебательные спектры подчиняются в сущности тем же закономерностям, что и электронные. Поглощение описывается законом Бэра. Интенсивность и такие явления, как линейный дихроизм (когда для исследования ориентированных образцов используют поляризованный свет), определяются соответствующими моментами переходов. Спектры полимеров не совпадают с суммой спектров мономерных звеньев, если соседние поглощающие группы в полимере взаимодействуют между собой.

ПРИНЦИПЫ, ЛЕЖАЩИЕ В ОСНОВЕ ИНФРАКРАСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Вообще говоря, инфракрасные (ИК) спектры должны содержать такую же информацию, что и спектры в видимой и УФ-областях, однако на самом деле данные по ИК-спектрам оказываются гораздо менее ценными. Причин тому несколько. Во-первых, для колебательных переходов характерна значительно меньшая интенсивность, чем для электронных. Например, коэффициент экстинкции оснований нуклеиновых кислот в ИК-области составляет $\sim 10^3$, в то время как для УФ-спектров эта величина на порядок больше. Следовательно, при регистрации ИК-спектра образец должен быть гораздо более концентрированным. Во-вторых, многие полосы ИК-спектров белков и нуклеиновых кислот расположены в той спектральной области, где наблюдается сильное поглощение воды. Использование D_2O вместо H_2O иногда помогает обойти эту трудность, но не решает проблему полностью. Наконец, соответствующие приборы, в частности инфракрасные детекторы, часто оказываются менее чувствительными, чем приборы, использующиеся при спектроскопических исследованиях в видимой и УФ-областях, что создает дополнительные трудности при получении точных количественных данных.

Колебательные полосы поглощения обычно порождаются переходами, которые можно довольно точно отнести к определенным химическим связям. Так, говорят о полосах, связанных с растяжением связей $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{N}$ или амидной группы и т.д. Это служит удобным способом описания, который является весьма точным для небольших молекул, но, вообще говоря, представляет собой значительное упрощение.

Колебания различных пар или групп атомов в молекулах связаны между собой, и колебания молекулы в целом, которые необходимо рассматривать при описании спектра, в принципе охватывают все атомы. Эти колебания нужно привести к нормальному виду, который отвечает стационарным состояниям гамильтониана, описывающего колебания молекулы. Любое конкретное колебание может быть представлено в виде линейной ком-

бинации нормальных колебаний. Таким образом, во многих случаях нельзя дать простую физическую интерпретацию возникновения той или иной колебательной полосы поглощения. Часто (но не всегда) данное нормальное колебание бывает связано с заметным смещением лишь двух связанных атомов, остальные атомы можно считать неподвижными. В таком случае описание спектрального перехода с использованием представлений об изгибе или растяжении конкретной связи может оказаться достаточно точным.

Как и для электронного спектра, интенсивность колебательной полосы зависит от величины индуцированного светом дипольного момента. Для нахождения этой величины обратимся к волновым функциям вида (7.5), где для разделения ядерного и электронного движений используется приближение Борна — Оппенгеймера. Чисто колебательный переход можно представить в виде

$$\Psi_0(r, R)\phi_v(R) \rightarrow \Psi_0(r, R)\phi_{v'}(R) \quad (8.82)$$

где ϕ_v и $\phi_{v'}$ относятся к двум разным колебательным состояниям, r и R — координаты электронов и ядер соответственно, а Ψ_0 — электронная волновая функция основного состояния. Матричный элемент оператора дипольного момента можно представить в виде

$$\langle \Psi_0 \phi_v | \underline{\mu} | \Psi_0 \phi_{v'} \rangle = \langle \phi_v | \underline{\mu}_e(R) | \phi_{v'} \rangle \quad (8.83)$$

где через $\underline{\mu}_e(R)$ обозначен интеграл по электронным координатам $\langle \Psi_0 | \underline{\mu} | \Psi_0 \rangle$, который является функцией ядерных координат R и представляет собой просто дипольный момент молекулы в основном электронном состоянии. Разложим $\underline{\mu}_e(R)$ в ряд Тейлора в окрестности R_0 — равновесного положения ядер:

$$\underline{\mu}_e(R) = \underline{\mu}_e(R_0) + \left(\frac{\partial \underline{\mu}_e(R)}{\partial R} \right)_{R_0} (R - R_0) + \dots \quad (8.84)$$

Подставив это выражение в формулу (8.83), мы увидим, что матричный элемент от первого члена разложения, который равен $\underline{\mu}_e(R_0) \langle \phi_v | \phi_{v'} \rangle$, обращается в нуль, так как ϕ_v и $\phi_{v'}$, будучи разными собственными функциями одного и того же гамильтониана, ортогональны. Второй член разложения (8.84) приводит к отличному от нуля выражению¹⁾

$$\langle \Psi_0 \phi_v | \underline{\mu} | \Psi_0 \phi_{v'} \rangle = \left(\frac{\partial \underline{\mu}_e(R)}{\partial R} \right)_{R_0} \langle \phi_v | R | \phi_{v'} \rangle \quad (8.85)$$

Таким образом, момент перехода представляется в виде произведения изменения дипольного момента для основного состояния при изменении колебательной координаты на матричный элемент самой этой координаты. Путем простого рассмотрения часто можно предсказать, способно ли данное колебание приводить к поглощению в инфракрасной области. Например, в линейной молекуле CO_2 колебания, отвечающие симметричному растяжению связей, не приводят к появлению полос поглощения в инфракрасной области, в то время как асимметричное растяжение связей и колебания, сопровождающиеся их изгибом, дают вклад в ИК-спектр. Моменты переходов будут направлены вдоль направления изменения дипольного момента:

¹⁾ Для молекулы, состоящей из трех или более атомов, выражение типа (8.85) следует записать для каждой из нормальных координат. Именно это обстоятельство символизирует знак частной производной в формулах (8.84) и (8.85). — *Прим.ред.*

Симметричное растяжение	$\rightarrow \text{O}=\text{C}=\text{O} \leftarrow$	Не сопровождается поглощением ИК-света	$\partial \underline{\mu} / \partial R = 0$
Асимметричное растяжение	$\vec{\text{O}}=\vec{\text{C}}=\text{O} \leftarrow$	Сопровождается поглощением	$\leftrightarrow \partial \underline{\mu} / \partial R$
Колебания, приводящие к изгибу связей	$\begin{array}{c} \text{O}=\text{C}=\text{O} \\ \downarrow \quad \downarrow \end{array}$	Сопровождается поглощением	$\updownarrow \partial \underline{\mu} / \partial R$

КОЛЕБАТЕЛЬНЫЕ СПЕКТРЫ ПОЛИМЕРОВ

Наиболее интересным в случае биополимеров является вопрос о влиянии конформации на нормальные колебания. Как и при анализе электронных спектров, имеет смысл уделить основное внимание изменению спектра хромофора при образовании той или иной вторичной структуры. В случае белков и полипептидов наибольший интерес вызывают три инфракрасные полосы. Все они связаны с колебательными переходами в пептидном остове и могут быть отнесены на счет нормальных колебаний простых групп атомов. Это полосы, отвечающие растяжению связей $\text{N}-\text{H}$ и $\text{C}=\text{O}$ с $\nu_{\text{max}} \sim 3300$ и $\sim 1630 - 1660 \text{ см}^{-1}$ (полоса амид I) соответственно и деформации связи $\text{N}-\text{H}$ с $\nu_{\text{max}} 1520 - 1550 \text{ см}^{-1}$ (полоса амид II). Эти полосы довольно легко зарегистрировать, поскольку каждое пептидное звено дает вклад в их интенсивность, а D_2O слабо поглощает в этой области.

В табл. 8.5 приведены некоторые характеристики указанных выше спектральных полос. Валентные колебания $\text{C}=\text{O}$ и $\text{N}-\text{H}$ поляризованы строго вдоль связей. Полоса амид II поляризована почти параллельно пептидной связи $\text{C}-\text{N}$ и, следовательно, почти перпендикулярно связи $\text{N}-\text{H}$. Оказывается, что колебания, порождающие эту полосу, представляют собой комбинацию примерно одинаковых вкладов от растяжения связи $\text{C}-\text{N}$ и деформации связи $\text{N}-\text{H}$.

Образование водородной связи приводит к сдвигу энергии этих трех пептидных колебаний (табл. 8.5). Две полосы, отвечающие валентным колебаниям, смещаются в область более низких энергий. Это легко понять, поскольку наличие водородной связи облегчает смещение кислорода карбонильной группы в направлении донора протона и азота амидной группы в направлении акцептора. Полоса амид II смещается в сторону больших энергий. Изогнуть связь $\text{N}-\text{H}$ становится труднее, так как водородные связи обладают почти линейной конфигурацией, и атом водорода стремится сохранить свое положение между двумя электроотрицательными атомами. Кроме того, из табл. 8.5 следует, что с помощью ИК-спектроскопии можно различать α -спирали и β -слои. В действительности это не всегда удастся из-за трудностей, которые мы рассмотрим ниже.

Для ориентированных полипептидных образцов мощным методом исследования структуры является инфракрасный дихроизм. В α -спирали пептидные водородные связи $\text{N}-\text{H} \dots \text{C}=\text{O}$ ориентированы параллельно продольной оси молекулы. Следовательно, при растяжении связей $\text{N}-\text{H}$ и $\text{C}=\text{O}$ (полоса амид I) будет поглощаться ИК-свет, поляризованный преимущественно вдоль оси спирали, а свойства полосы амид II будут прямо противоположными. На рис. 8.26 представлен типичный спектр линейного дихроизма α -спирали. В случае β -слоя продольная ось структуры лежит вдоль направления пептидной цепи. Пептидные водородные связи перпендикулярны этой оси (см. рис. 2.23), и, следовательно, в ориентированных β -слоях каждая полоса будет иметь дихроизм, противоположный тому, который наблюдается для соответствующих полос α -спирали.

Таблица 8.5

ХАРАКТЕРИСТИКИ ОСНОВНЫХ ИНФРАКРАСНЫХ ПОЛОС ПОГЛОЩЕНИЯ ПЕПТИДНОЙ ГРУППЫ¹⁾

Колебание	$\frac{\partial \mu}{\partial R}$	Структуры с водородными связями				Структуры без водородных связей
		α -спираль		β -слой		частота, см ⁻¹
		частота, см ⁻¹	дихроизм	частота, см ⁻¹	дихроизм	
Растяжение связи N—H	— N—H — ↔	3290—3300		3280—3300	⊥	~ 3400
Амид I (растяжение связи C=O)	— C=O — ↔	1650—1660		1630	⊥	1680—1700
Амид II	$\begin{array}{c} \\ \text{H} \\ \\ -\text{C}-\text{N}- \\ \end{array} \leftrightarrow$	1540—1550	⊥	1520—1525		< 1520?

¹⁾ J.A.Schellman, C.Schellman. In: The Proteins, 2d ed., vol. 2, ed. H.Neurath, New York, Academic Press, 1962, p 1.

Такое рассмотрение, однако, является весьма упрощенным. В полипептидах и белках колебания отдельных пептидных групп взаимосвязаны аналогично тому, как связаны между собой электронные переходы. Каждая колебательная полоса поглощения мономера в полимере расщепляется на ряд полос. Эти полосы имеют разную интенсивность, а иногда и разную поляризацию. Таким образом, спектр полимера может быть гораздо более сложным, чем спектр мономера. К счастью, симметрия спиральных полимеров позволяет упорядочить этот «чаотокол» полос. Для полимеров типа α -спирали Т. Миязава показал, что каждый мономерный переход порождает в полимере две интенсивные полосы. Одна — при частоте $\nu_{||}(0)$ — поляризована параллельно оси спирали, две другие — выродившиеся полосы с частотой $\nu_{\perp}(2\pi/n)$ — поляризованы перпендикулярно оси. Характеристики этих полос зависят от числа остатков n , приходящихся на виток. Эти результаты находятся в полном согласии с данными о расщеплении электронных полос поглощения пептидных хромофоров при наличии экситонных эффектов. Спектры, иллюстрирующие расщепление колебательных полос α -спиральных полипептидов, приведены на рис. 8.26. Заметим, что полосы, соответствующие поглощению параллельно поляризованного света, имеют $\nu_{\max} = 1518$ и 1652 см^{-1} , а полосы, соответствующие поглощению перпендикулярно поляризованного света, — $\nu_{\max} = 1549$ и 1655 см^{-1} . Эти различия в частотах являются следствием расщепления полос амид I и амид II с частотами $\nu_{||}(0)$ и $\nu_{\perp}(2\pi/n)$ соответственно.

При анализе ИК-спектров антипараллельных β -слоев необходимо рассмотреть колебания основной асимметричной единицы (рис. 8.27). Поскольку последняя включает в себя четыре пептидные группы, каждая колебательная полоса отдельного мономера расщепляется в антипараллельном β -слое на четыре полосы. В случае амидных полос одна из них

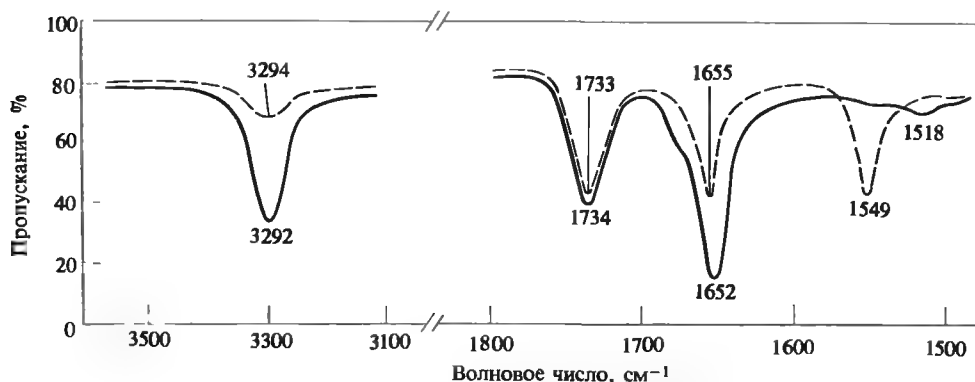


РИС. 8.26. Инфракрасный дихроизм ориентированных пленок поли- γ -бензил-L-глутаминовой кислоты. Свет был поляризован параллельно (сплошные линии) и перпендикулярно (штриховые линии) оси волокон. [M. Tsuboi, J. Poly. Sci., **59**, 139 (1962).]

Таблица 8.6.

НАБЛЮДАЕМЫЕ И ВЫЧИСЛЕННЫЕ ПАРАМЕТРЫ ИНФРАКРАСНЫХ СПЕКТРОВ ПОЛИПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ ^{1), 2)}

Конформация	Колебание	Частота колебаний, см ⁻¹			
		полоса амид I		полоса амид II	
		вычисленная	обычно наблюдаемая	вычисленная	обычно наблюдаемая
α -Спираль	$\nu_{ }(0)$	(1650)	1650	(1516)	1516
	$\nu_{\perp}(2\pi/n)$	1647	1652	1540	1546
Антипараллельный β -слой	$\nu_{ }(0, \pi)$	(1685)	1685	(1530)	1530
	$\nu_{\perp}(\pi, 0)$	(1632)	1632	1540	-
Параллельный β -слой	$\nu_{\perp}(\pi, \pi)$	1668	-	1550	-
	$\nu_{ }(0, 0)$	1648	1645	1530	1530
Беспорядочная структура	$\nu_{\perp}(\pi, 0)$	1632	1630	1550	1550
	ν_0	1658	1656	1535	1535

¹⁾ J.A. Schellman, C. Schellman. In: The Proteins, 2d ed., vol. 2, ed. H. Neurath, New York, Academic Press, 1962, р. 1.

²⁾ Значения в скобках получены в результате подгонки к экспериментальным данным путем выбора соответствующих параметров.

не проявляется в ИК-спектрах, две другие поляризованы перпендикулярно, а четвертая — параллельно. В табл. 8.6 представлены результаты расчетов параметров нормальных колебаний, выполненные Миязавой для α -спиралей и β -слоев, и соответствующие экспериментальные данные. Для полос амид I и амид II наблюдается превосходное

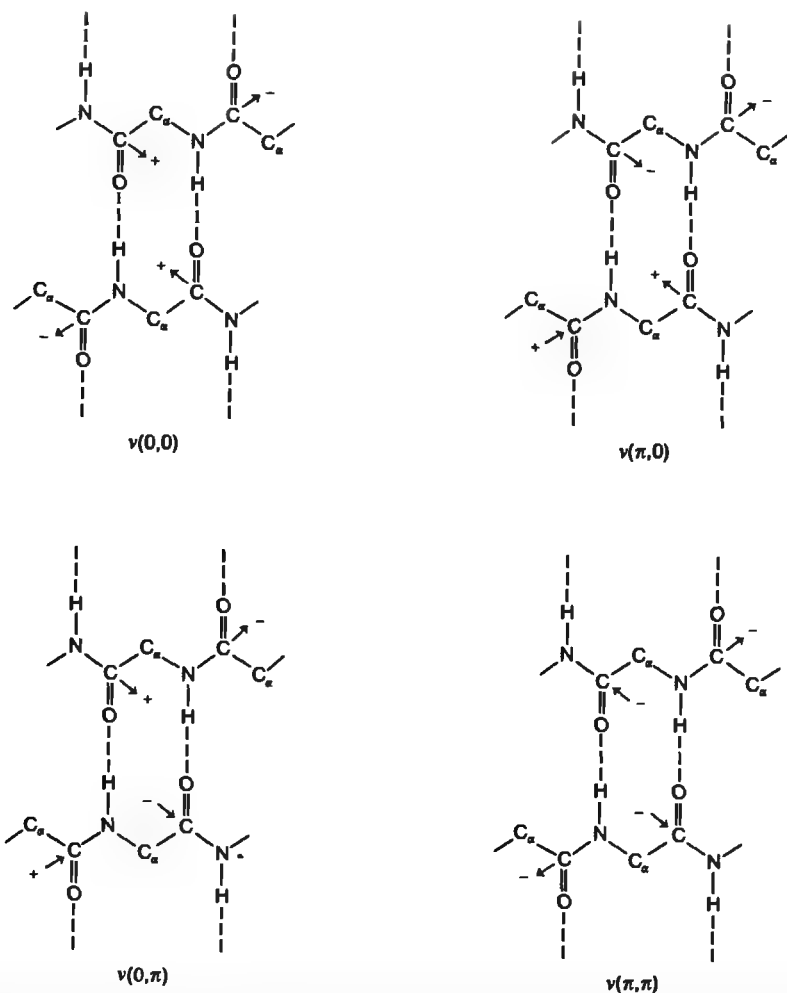


РИС. 8.27. Схематическое представление нормальных колебаний в антипараллельном β -слое. Стрелки обозначают компоненты моментов переходов, лежащие в плоскости рисунка, знаки плюс и минус — компоненты, перпендикулярные плоскости. [Т. Miyazawa, J. Chem. Phys., **32**, 1647 (1960).]

совпадение данных. Таким образом, подобные расчеты могут служить рациональной основой при интерпретации ИК-спектров полипептидов и белков.

Кроме трех рассмотренных выше пептидных полос имеются и другие полосы, отвечающие колебаниям атомов пептидных групп, а также полосы поглощения, соответствующие колебаниям различных боковых групп. Подробное обсуждение всех этих вопросов выходит за рамки нашей книги.

Для сахарофосфатного остова и азотистых оснований нуклеиновых кислот характерен гораздо более сложный набор колебаний, чем для пептидов. Происхождение большинства полос здесь установлено с меньшей определенностью. Главное внимание было уделено спектральной области между 1500 и 1800 см^{-1} , в которой сосредоточены колебания кар-

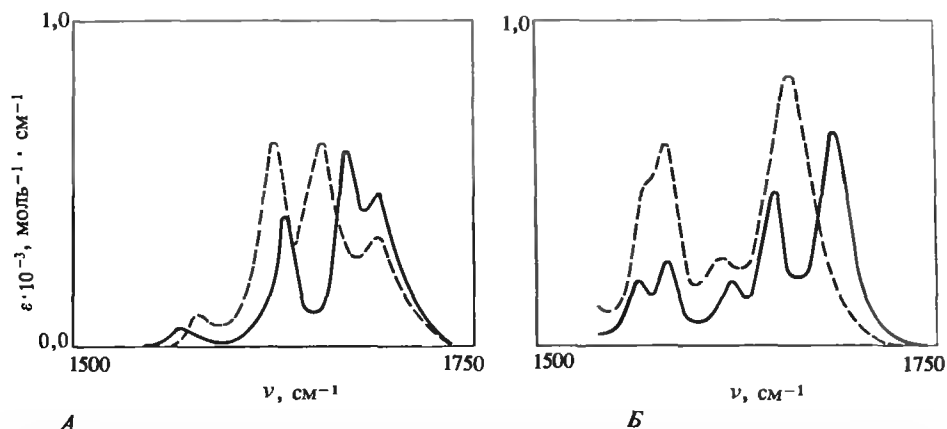


РИС. 8.28. Изменения инфракрасных спектров при образовании пар оснований. А. Спектр двойной спирали poly(rA·rU) (сплошная линия) и сумма спектров poly(rA) и poly(rU) (штриховая линия). Б. Двойная спираль poly(rG·rC) (сплошная линия) и сумма спектров мононуклеотидов G и C (штриховая линия). Все измерения проводились в D₂O при pH 7 и температуре $\leq 65^\circ\text{C}$. [G. J. Thomas, Biopolymers, 7, 325 (1969).]

бонильной группы, а также колебания, отвечающие изменению длины двойных связей пуринового и пиримидинового колец. Эти колебания чрезвычайно чувствительны к образованию пар оснований, поскольку колеблющиеся атомы непосредственно участвуют в образовании водородных связей. Типичный пример такого рода представлен на рис. 8.28. Из него ясно видно, что разрыв водородных связей приводит к изменению ИК-спектров, причем эти изменения оказываются более существенными, чем в случае УФ-спектров (см. гл. 7). Это преимущество отчасти компенсирует те трудности, которые сопряжены с проведением ИК-измерений. К тому же каждому из четырех обычных оснований соответствует в этой спектральной области характерный ИК-спектр, что позволяет исследовать пары GC и AU по отдельности. Вопросы, связанные с влиянием конформационных изменений нуклеиновых кислот на их ИК-спектры, исследованы гораздо менее детально, чем в случае УФ-спектров. Развитие этого потенциально очень мощного метода тормозит то, что для проведения исследований необходимы большие количества вещества; кроме того, здесь имеются и большие экспериментальные трудности.

СПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

Еще одним методом, позволяющим получить информацию о колебательных состояниях молекул, является спектроскопия комбинационного рассеяния. Пусть на образец падает интенсивный пучок света частоты ν . В молекулах образца будет индуцироваться осциллирующий дипольный момент, даже если при частоте ν не происходит электронное или колебательное возбуждение. Пусть, далее, электрическое поле световой волны меняется во времени как $E(t) = E_0 \cos 2\pi\nu t$; тогда в соответствии с уравнением (7.57) индуцированный дипольный момент молекулы будет равен

$$\mu(t) = \alpha(\nu) \cdot E_0 \cos 2\pi\nu t \quad (8.86)$$

Поляризуемость α , вообще говоря, представляет собой тензор, но мы можем считать ее скалярной величиной $\alpha(\nu)$.

Поляризуемость колеблющейся молекулы не остается постоянной во времени. Движения ядер вызывают смещения электронов, и любому данному положению ядер отвечает своя поляризуемость. Эту зависимость можно представить в виде

$$\alpha(\nu) = \alpha_0(\nu) + \alpha'(\nu) \cos 2\pi\nu't \quad (8.87)$$

где α_0 — поляризуемость молекулы при равновесном положении ядер, $\alpha'(\nu)$ описывает изменение поляризуемости при смещениях ядер, ν' — частота колебаний. Решая совместно уравнения (8.86) и (8.87), получаем

$$\begin{aligned} \mu(t) &= E_0[\alpha_0(\nu) + \alpha'(\nu) \cos 2\pi\nu't] \cos 2\pi\nu t = \\ &= E_0\alpha_0(\nu) \cos 2\pi\nu t + E_0\alpha'(\nu) \cos 2\pi\nu't \cos 2\pi\nu t = \\ &= \mu(t) + \mu'(t) \end{aligned} \quad (8.88)$$

Первый член в этом выражении соответствует колебаниям индуцированного диполя с частотой ν . Эти колебания ответственны за рассеяние и за преломление света. Второй член отвечает комбинационному рассеянию. Это можно понять, воспользовавшись равенством $\cos A \cos B = (\frac{1}{2})[\cos(A+B) + \cos(A-B)]$ и переписав $\mu'(t)$ в виде

$$\mu'(t) = 2\{E_0\alpha(\nu)[\cos 2\pi(\nu + \nu')t + \cos 2\pi(\nu - \nu')t]\} \quad (8.89)$$

Диполь, совершающий колебания с заданной частотой, излучает свет этой же частоты, причем интенсивность излучения пропорциональна $(\mu')^2$. Из уравнения (8.89) следует, что при облучении колеблющейся молекулы светом частоты ν излучается свет с частотами $\nu + \nu'$ и $\nu - \nu'$. Положение полос испускания (относительно положения возбуждающего пика) дает значение колебательной частоты ν' . Спектральная полоса с частотой, меньшей, чем у возбуждающего света, называется стоксовой, а с большей — антистоксовой. Может показаться парадоксальным, что образец способен испускать фотоны, энергия которых больше, чем у возбуждающих фотонов. Отметим, однако, что спектры комбинационного рассеяния порождаются двухфотонными процессами. Если система поглощает два фотона частоты ν и испускает один фотон частоты $\nu - \nu'$, а другой — $\nu + \nu'$, то суммарное изменение энергии равно нулю¹⁾.

В случае малых молекул спектроскопия комбинационного рассеяния дополняет инфракрасную спектроскопию. Для появления полос комбинационного рассеяния необходимо, чтобы движения ядер приводили к изменению поляризуемости, а не постоянного дипольного момента. Поэтому некоторые переходы, с трудом наблюдаемые одним методом, могут проявиться в виде весьма интенсивных полос, если воспользоваться другим. В случае больших асимметричных молекул оба метода регистрируют одни и те же полосы. Основным преимуществом спектроскопии комбинационного рассеяния является то, что вода здесь поглощает довольно слабо. Следовательно, метод удобен при изучении биологических систем в водных растворах.

¹⁾ Согласно квантовой теории, антистоксова компонента при комбинационном рассеянии наблюдается тогда, когда фотон рассеивается на молекуле, находящейся на возбужденном колебательном уровне, который отвечает колебанию с частотой ν' . В этом случае после рассеяния молекула теряет энергию колебательного кванта $h\nu'$, а частота рассеянного фотона увеличивается на величину ν' . Обычно антистоксова компонента имеет незначительную интенсивность, так как для частот, с которыми имеет дело метод комбинационного рассеяния, вероятность нахождения молекулы в колебательно-возбужденном состоянии очень мала. — *Прим. ред.*

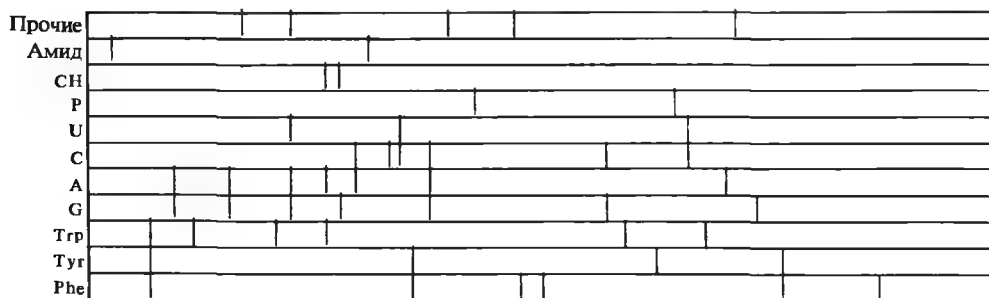
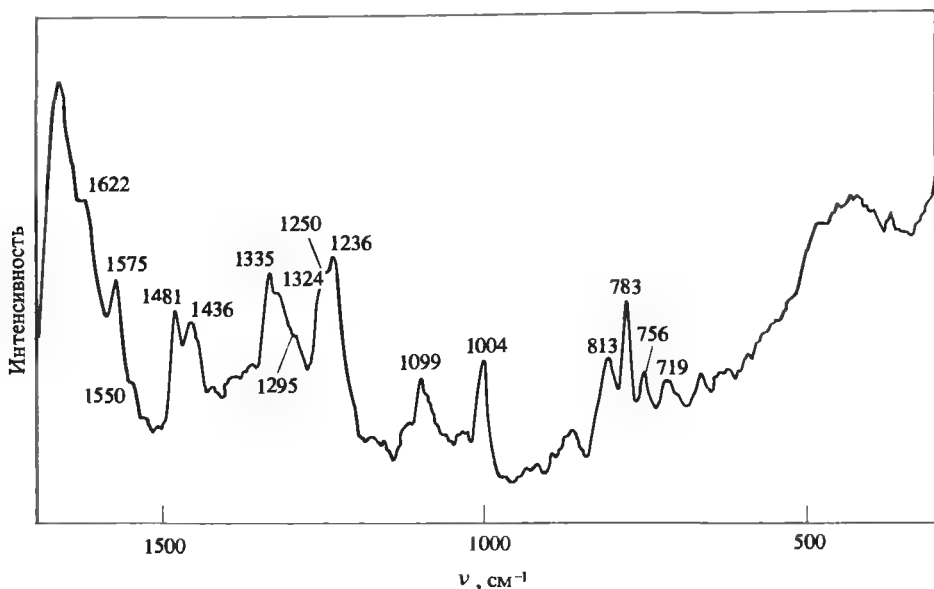


РИС. 8.29. Спектр комбинационного рассеяния интактного бактериофага MS2, полученный с использованием аргонового лазера. Экспериментальные условия: $60 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ MS2 в $0,75 \text{ M}$ водном растворе KCl при 32°C . Внизу приведены линии комбинационного рассеяния, характерные для различных групп белков и нуклеиновых кислот. [G. J. Thomas et al., J. Mol. Biol., **102**, 103 (1976).]

Спектроскопия комбинационного рассеяния находит особенно широкое применение при исследовании комплексов белков с нуклеиновыми кислотами. Спектры комбинационного рассеяния даже таких сложных объектов, как целые бактериофаги, состоят из большого числа хорошо разрешенных полос (см. рис. 8.29). Многие из этих полос удается соотнести с колебаниями пептидной группы или боковых групп белковой молекулы или же с колебаниями фосфатных групп или азотистых оснований нуклеиновых кислот, а некоторые из них оказываются чувствительными к конформации.

Табл. 8.7 иллюстрирует зависимость параметров полос амид I и амид II в спектрах комбинационного рассеяния некоторых полипептидов от вторичной структуры. Налицо четкие различия между α -спиралями, β -слоями и беспорядочными конформациями.

Таблица 8.7

КОЛЕБАТЕЛЬНЫЕ ЧАСТОТЫ ПЕПТИДОВ, НАБЛЮДАЕМЫЕ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ
ПРИ ПОМОЩИ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ ^{1), 2)}

Полипептид	Частота, см ⁻¹					
	полоса амид I			полоса амид II		
	α -спираль	β -слой	беспорядочная конформация	α -спираль	β -слой	беспорядочная конформация
Полиглицин	-	1674 (П)	-	-	1234	-
Поли-L-аланин	1658 (С)	1666	-	1261 (С)	1234	-
Поли-L-глутамин	-	-	1665	-	-	1248
Глюкагон	1658	1672	-	1266	1232	1248
Поли-L-лизин	1645	1670 (П)	-	1311	1240	1253

¹⁾ W.L. Peticolas, Biochemie, 57, 417(1975).

²⁾ П — плечо; С — слабая.

Таблица 8.8

ИЗМЕНЕНИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ ПОЛОС КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ
ПРИ ВОЗРАСТАНИИ СТЕПЕНИ УПОРЯДОЧЕННОСТИ
(ОБРАЗОВАНИЕ ПАР ИЛИ СТЭКИНГ ОСНОВАНИЙ) НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ¹⁾

Основание	Частота колебания, см ⁻¹	Изменение интенсивности с ростом упорядоченности ²⁾
Аденин	725	Уменьшается
	1304	"
	1380	"
	1520	"
Урацил	790	"
	1240	"
Гуанин	670	Увеличивается
	1485	Уменьшается
	1580	"
Цитозин	790	Уменьшается и сдвигается
	1256	Уменьшается при pH < 6,8
	1547	То же

¹⁾ W.L. Peticolas, Biochemie, 57, 417 (1975).

²⁾ Все данные (если не оговорено особо) получены при нейтральных значениях pH.

Точно так же как и в случае инфракрасных спектров, полосы спектров комбинационного рассеяния сдвигаются и расщепляются при изменении конформации системы. Кроме

того, здесь наблюдается гипохромный эффект. В табл. 8.8 представлены данные об изменении интенсивности полос комбинационного рассеяния в зависимости от того, расположены ли основания полинуклеотидов в виде стопок или образуют водородные связи.

До недавнего времени спектроскопия комбинационного рассеяния применялась для исследования биополимеров не слишком широко из-за различных экспериментальных трудностей. Даже после прохождения через монохроматор рассеянный свет зачастую содержал значительные примеси возбуждающего света из-за частичного перекрывания соответствующих полос. Эта проблема была в основном решена благодаря применению лазеров, обладающих существенно большей спектральной чистотой (монохроматичностью). Как только были сконструированы лазеры, испускающие свет в достаточно широком диапазоне частот, появилась возможность создания новых эффективных вариантов спектроскопии комбинационного рассеяния. Предположим, что частота возбуждающего света близка к частоте поглощения образца. Тогда поляризуемость при этой частоте будет в основном определяться поляризуемостью поглощающего хромофора (ср. рис. 7.20, А). Таким образом, как это качественно видно из уравнений (8.87) — (8.89), интенсивность полос комбинационного рассеяния, отвечающих колебаниям этого хромофора, резко возрастет. Этот эффект носит название резонансного комбинационного рассеяния. Он позволяет изучать колебательные спектры отдельных хромофоров даже при наличии огромного числа других колебаний.

Краткие выводы

Рассмотрены три спектроскопических метода, с помощью которых можно получить разного рода информацию о структуре макромолекул. Оптически активные образцы обладают рядом свойств, среди которых наиболее удобным для исследования является круговой дихроизм (КД), т.е. способность по-разному поглощать лево- и правополяризованный свет. Существенное влияние на КД оказывает взаимодействие между соседними хромофорами, которое убывает с ростом расстояния между хромофорами приблизительно как R^{-2} и зависит от относительной ориентации хромофоров. Следовательно, КД особенно чувствителен к типу вторичной структуры белков и нуклеиновых кислот и протяженности структурных областей. Например, спектры КД α -спирали, β -слоя и беспорядочной конформации четко различаются. Путем подгонки спектров белков к затабулированному спектру полипептидов с известной конформацией удастся довольно надежно установить долю каждого из типов вторичной структуры в данном белке.

Флуоресценция более чувствительна к окружению, чем поглощение, поскольку процессы испускания охватывают сравнительно протяженный период времени. Можно регистрировать стационарные спектры излучения либо исследовать истинную кинетику затухания излучения. При достаточно близком расположении двух хромофоров происходит перенос энергии. Возбуждая один хромофор, можно наблюдать флуоресценцию другого. Вероятность переноса обратно пропорциональна шестой степени расстояния между хромофорами. Таким образом, измеряя эффективность переноса энергии, можно найти расстояние между двумя характерными точками макромолекулы. При пропускании через жесткие или замороженные образцы поляризованного света наблюдается преимущественное поглощение хромофорами, обладающими моментами переходов, ориентированными параллельно направлению поляризации. В отсутствие молекулярного движения флуоресценция будет иметь предельную поляризацию. Характерное время вращения молекул типичных белков и нуклеиновых кислот в растворе составляет от 10 до 100 нс, в то время как время затухания флуоресценции лежит в интервале от 1 до 30 нс. Таким образом, наблюдаемая для растворов степень поляризации определяется соотношением между временами затухания флуоресценции и молекулярного вращения. При помощи поляризационных

измерений можно определять размер и форму макромолекул, а также исследовать гибкость изучаемых структур.

Методами инфракрасной спектроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния изучают молекулярные колебания. Поскольку эти колебания часто бывают связаны с определенными группами атомов, данные методы в принципе позволяют получать детальную информацию о структуре макромолекул. Колебательные спектры поглощения, как и электронные спектры, чувствительны к конформации молекул и к взаимодействию между соседними хромофорами. Однако на практике эти методы используются реже других, поскольку для измерений необходимы большие количества вещества; исключение составляет новейшая лазерная спектроскопия комбинационного рассеяния.

Задачи

8.1. Белок имеет три идентичных центра связывания, образующие равносторонний треугольник. Если с одним из них связывается краситель (донор), то измеряемый квантовый выход его флуоресценции (ϕ_D) составляет 0,5. Присоединение ко второму центру акцептора приводит к уменьшению ϕ_D до 0,25. Чему будет равен квантовый выход флуоресценции донора, если в один центр поместить донор, а в два других — акцептор?

8.2. Степень анизотропии флуоресценции меченного красителем белка измеряли сначала в зависимости от температуры при заданной вязкости (0,02 пуаза), а затем — при постоянной температуре (293 К) и переменной вязкости. Получившиеся перреновские графики оказались различными (рис. 8.30). Объясните поведение экспериментальных кривых, а именно: различие наклонов при высоких значениях T/η , различия в величинах A_0 , получаемых с помощью линейной экстраполяции к значению $T/\eta = 0$, и совпадение данных при температурах ниже ~ 300 К.

8.3. Предположим, что мы хотим установить, одинаково ли расположены основания в двух динуклеозидфосфатах, dApdA и rApгA. Однако оба соединения существуют в виде равновесных смесей двух форм: в одной из них основания расположены стопкообразно, в другой — нет. Константы равновесия соответствующих переходов неизвестны и их не просто измерить, можно лишь утверждать, что они различаются. Покажите, как путем измерения КД мономеров и димеров можно прямо сравнить стопкообразные формы, предполагая лишь, что спектр КД «нестопочной» формы в точности совпадает с суммой КД изолированных мономеров.

8.4. Какая из следующих хромофорных пар будет иметь спектр КД, отличный от спектра КД изолированных хромофоров?

а. Рис. 8.31, А: все моменты переходов лежат в одной плоскости.

б. Рис. 8.31, Б: все моменты переходов лежат в одной плоскости.

в. Рис. 8.31, В: m_1 и m_2 равны нулю, μ_1 лежит в плоскости, параллельной плоскости μ_2 , но расположенной выше.

г. Рис. 8.31, Г: остальное так же, как на рис. В.

д. Рис. 8.31, Д: оба момента перехода расположены в одной плоскости, остальное — как на рис. В.

е. Рис. 8.31, Е: остальное — как на рис. В.

ж. Рис. 8.31, Ж: остальное — как на рис. В.



РИС. 8.30.

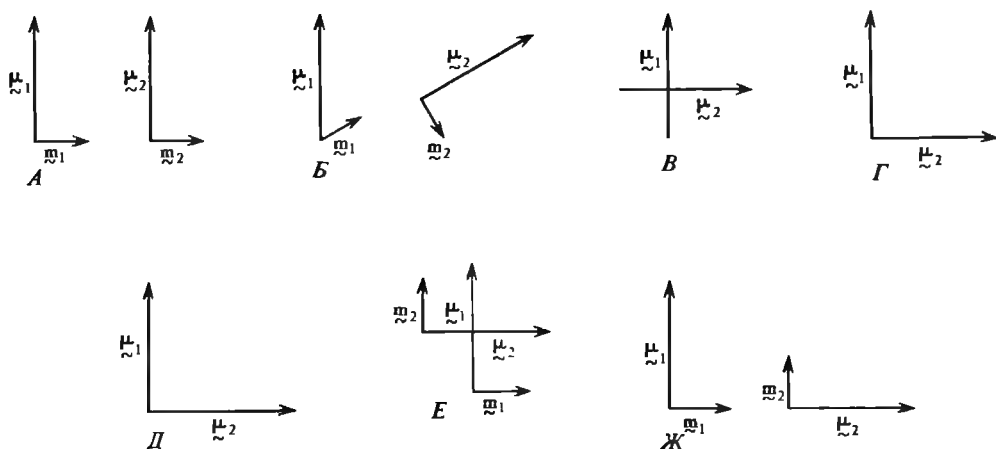


РИС. 8.31.

8.5. Как использовать идеи метода «возмущения растворителем» применительно к ИК-спектрам и спектрам комбинационного рассеяния с тем, чтобы отличить экспонированные аминокислотные остатки белковой молекулы от остатков, находящихся внутри ее? Как объяснить, что в чистой D_2O частоты ИК-полос нескольких внутренних остатков оказались выше, чем для экспонированных остатков в белке с малым содержанием α -спиралей или β -слоев?

ЛИТЕРАТУРА

Общая

- Jirgensens B.*, 1973. Optical Activity of Proteins and Other Macromolecules, 2d ed., New York, Springer-Verlag.
- Pesce A.J., Rosen C.G., Pasby T.L.*, 1971. Fluorescence Spectroscopy: An Introduction for Biology and Medicine, New York, Marcel Dekker.
- Steiner R.F., Weinryb I., eds.*, 1971. Excited States of Proteins and Nucleic Acids, New York, Plenum Press.
- Tinoco I., Jr., Cantor C.R.*, 1970. Applications of optical rotatory dispersion and circular dichroism to the study of biopolymers, *Methods Biochem. Anal.*, **18**, 81.

Специальная

- Belford G.C., Belford R.C., Weber G.*, 1972. Dynamics of fluorescence polarization in macromolecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 1392. [Ознакомившись с этой работой и со статьей Хуанга и Эйзеншталя (Chuang, Eisenthal, 1972), можно получить полное представление о поляризованной флуоресценции анизотропных тел.]
- Bush C.A.*, 1974. Ultraviolet spectroscopy, circular dichroism and optical rotatory dispersion. In: *Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry*, ed. P.P.P. Ts'o, New York, Academic Press, vol. 2, p. 91.
- Cantoni G.C., Davies D.R., eds.*, 1971. *Procedures in Nucleic Acid Research*, vol. 2, New York, Harper and Row. [Хорошие статьи о флуоресценции, КД, инфракрасной спектроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния нуклеиновых кислот.]
- Charney E.*, 1979. *The Molecular Basis of Optical Activity*, New York, Wiley. [Полный и весьма современный трактат.]
- Chen R.F., Edelhoch H.*, 1975. *Biochemical Fluorescence*, 2 vols., New York, Marcel Dekker.
- Chuang T.J., Eisenthal K.B.*, 1972. Theory of fluorescence depolarization by anisotropic rotational diffusion, *J. Chem. Phys.*, **57**, 5094.
- Fairclough R., Cantor C. R.*, 1977. The use of singlet-singlet energy transfer to study macromolecular assemblies. In: *Methods of Enzymology*, vol. 48, eds. C.H.W. Hirs and S.N. Timasheff, New York, Academic Press, p.347. [Подробное обсуждение вопросов, связанных с переносом энергии.]
- Fasman G.D., ed.*, 1967. *Poly- α -Amino Acids*, New York, Marcel Dekker. [Содержит много полезных статей.]
- Fraser R.D.B., Suzuki E.*, 1970. Infrared methods. In: *Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry*, vol. B, ed. S.J. Leach, New York, Academic Press, p.213.
- Holmquist B., Vallee B.M.*, 1978. Magnetic circular dichroism. In: *Methods of Enzymology*, vol.49, eds. C.H.W. Hirs and S.N. Timasheff, New York, Academic Press, p.149.
- Lehrer S.S., Learis P.S.*, 1978. Solute quenching of protein fluorescence. In: *Methods in Enzymology*, vol.49, eds. C.H.W. Hirs and S.N. Timasheff, New York, Academic Press, p.222.
- Mandel R., Holzwarth G.*, 1972. Circular dichroism of oriented helical polypeptides: The alpha-helix, *J. Chem. Phys.*, **57**, 3469.
- Mertzbacher E.L.*, 1961. *Quantum Mechanics*, New York, Wiley.
- Parker C. A.*, 1968. *Photoluminescence of Solutions*, Amsterdam, Elsevier. [Основательное руководство по различным проявлениям флуоресценции и их экспериментальному исследованию.]
- Sears D., Beychok S.*, 1973. Circular dichroism. In: *Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry*, vol. C, ed. S.J. Leach, New York, Academic Press, p.445. [Хорошее изложение теории КД полимеров.]
- Schellman J.A.*, 1975. Circular dichroism and optical rotation, *Chem. Revs.*, **75**, 323. [Хорошее обсуждение теоретических основ КД.]
- Schellman J.A., Nielsen E.B.*, 1967. Optical rotation and conformation studies on diamide models. In: *Conformation of Biopolymers*, ed. G.N. Ramachandran, New York, Academic Press, vol.1, p.109. [Пасмотрены $n \rightarrow \pi^*$ - и $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходы в дипептидах.]
- Shurcliff W.A., Ballard S.S.*, 1964. *Polarized Light*, Princeton, VanNostrand.

- Steinberg I.Z.*, 1978. Circular polarization of luminescence: Biochemical and biophysical applications, *Ann. Rev. Biophys. Bioengin.*, 7, 133.
- Stryer L.*, 1968. Fluorescence spectroscopy of proteins, *Science*, 162, 526.
- Turner D.H.*, 1978. Fluorescence-detected circular dichroism. In: *Methods in Enzymology*, vol. 49, eds. C.H.W. Hirs and S.N. Timasheff, New York, Academic Press, p. 199.
- Van Wart H.E., Scheraga H.A.*, 1978. Raman and resonance Raman spectroscopy. In: *Methods in Enzymology*, vol. 49, eds. C.H.W. Hirs and S.N. Timasheff, New York, Academic Press, p. 67.
- Weber G.*, 1972. Uses of fluorescence in biophysics: Some recent developments, *Ann. Rev. Biophys. Bioengin.*, 1, 553

Глава 9 Введение в магнитный резонанс

9.1. Резонансные методы и их применение

Как явствует из содержания предыдущих глав, всестороннее исследование оптических свойств биологических молекул позволяет получить много ценной информации об их структуре и функциях. Наряду с этим в последние годы все большее значение приобретает изучение магнитных свойств биологических объектов. Это стало возможным благодаря развитию методов ядерного магнитного резонанса и электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) ¹⁾.

Во многих своих применениях ЯМР используется как спектроскопический метод (подобно абсорбционной спектроскопии в инфракрасной, видимой и ультрафиолетовой областях, рассмотренной в гл. 7 и 8). В спектроскопии ЯМР регистрируется энергия, поглощаемая при переходах ядер с одного уровня магнитной энергии на другой. При этом определяется зависимость энергии либо от внешнего магнитного поля, либо от частоты электромагнитного излучения. Эта зависимость поглощения от силы поля или от его частоты и представляет собой спектр ЯМР. Такие спектры оказываются весьма информативными, поскольку ядрам данного вида, входящим в состав молекулы (например, ядрам атомов водорода в различных положениях), обычно отвечают разные линии в спектре ЯМР. Полосы поглощения близких по своей природе хромофоров, лежащие в оптическом диапазоне, чаще всего сильно перекрываются; напротив, в спектрах ЯМР благодаря их очень высокой чувствительности к локальному окружению сигналы от различных ядер водорода часто оказываются хорошо разрешенными. Поэтому спектры ЯМР служат своего рода «отпечатками пальцев» малых молекул: с их помощью удастся выявить даже незначительные различия в структуре таких молекул.

Высокая чувствительность спектров ЯМР к структурным особенностям нашла свое применение и в исследованиях биологических макромолекул: по изменениям спектра отдельных участков этих молекул иногда удастся судить, например, о наличии в системе специфического лиганда или о конформационных изменениях. Если в ходе изучаемого процесса какая-либо молекула периодически меняет свое окружение, то спектры ЯМР одного из ее ядер часто могут служить источником количественной информации о частоте этих изменений. Еще одной привлекательной особенностью ЯМР является возможность измерять расстояния между ядрами в сложных ассоциатах, например в фермент-субстратных комплексах.

В своей основе ЭПР не отличается от ЯМР: резонанс в ЭПР наблюдается при переходе электрона с одного магнитного уровня энергии на соседний. Однако, поскольку для наблюдения ЭПР молекула должна обладать неспаренным электроном, а у большинства молекул электронные оболочки заполнены, этот метод пригоден для исследования лишь весьма ограниченного круга соединений. Правда, в случае биологических объектов этот недостаток иногда оборачивается преимуществом. Например, парамагнитные центры флавинов, бактериохлорофиллов и пероксидаз служат естественными зондами, а их исследование при помощи ЭПР не осложняется посторонними сигналами, так как все остальные группы этих молекул диамагнитны. Когда исследуемая система не содержит

¹⁾ В зарубежной литературе наряду с сокращением ESR часто встречается ESR — электронный спиновый резонанс.

парамагнитных центров, можно использовать спиновую метку — относительно небольшую молекулу, содержащую неспаренный электрон и способную связываться с определенными центрами исследуемой молекулы. Спектры ЭПР таких меток часто содержат интересную информацию о структуре участка молекулы, непосредственно прилегающего к центру связывания с меткой, и о его роли в функционировании молекулы.

Чтобы подробно осветить все вопросы, связанные с ЯМР и ЭПР и их применением в биологии, необходимо написать отдельную книгу. Поэтому мы ограничимся изложением лишь основных принципов и отдельных примеров применения данных методов. Мы надеемся, что рассмотренный материал послужит неплохим введением в обширный круг проблем использования методов магнитного резонанса в биологии.

9.2. Общие принципы ядерного магнитного резонанса (ЯМР)

Природу магнитного резонанса можно до конца понять только с помощью квантовой механики, однако многие основные его концепции вполне могут быть изложены в классических рамках. Такой подход обладает очевидными преимуществами, поскольку придает многим квантовомеханическим положениям наглядный физический смысл.

В качестве иллюстрации классических и квантовых представлений рассмотрим идеи, лежащие в основе измерений поглощения при ЯМР. Согласно классической физике, ядро, обладающее магнитным моментом, взаимодействует с постоянным магнитным полем H , причем энергия взаимодействия равна $E = -\mu_m \cdot H$ (в квантовой механике это выражение заменяется на гамильтониан взаимодействия). Однако проекция ядерного магнитного момента μ_m на направления поля изменяется не произвольно, как это имеет место в классической физике, а квантуется. Следовательно, и энергия взаимодействия с магнитным полем E также квантуется (в единицах $\hbar$). Это значит, что ядерный магнитный момент может иметь только строго определенные разрешенные ориентации, которым отвечает определенный набор энергетических уровней. В экспериментах по ЯМР индуцируют переходы между соседними энергетическими уровнями объекта, отстоящими друг от друга на величину ΔE . Для этого прикладывают внешнее поле изменяющейся частоты. Когда частота поля ω становится такой, что $\hbar\omega = \Delta E$, происходит поглощение энергии, расходуемой на перевод ядер из одного состояния в другое. Иначе говоря, наблюдается резонанс.

Однако явление резонанса можно понять и при рассмотрении взаимодействия магнитного поля с ядром, обладающим магнитным моментом, в рамках классической физики. Здесь допускается непрерывное распределение по ориентациям магнитных моментов во внешнем поле, а ядра представляются в виде прецессирующих вокруг направления магнитного поля волчков с частотой прецессии, называемой ларморовой частотой. Вводится возмущающее поле переменной частоты, и когда его частота достигает ларморовой частоты прецессии ядер, происходит поглощение энергии, отвечающее изменению ориентации магнитного момента ядер относительно постоянного поля.

Далее мы будем рассматривать основы магнитного резонанса в рамках классической физики, хотя при необходимости иногда будем обращаться и к квантовомеханическому анализу. Хотя классический подход нельзя считать строгим, с его помощью удастся глубже вникнуть в физический смысл и понять многие аспекты этого явления. Опираясь на представленный здесь материал, интересующийся читатель сможет разобраться и в более строгом квантовомеханическом толковании (см. ссылки в конце главы).

ПРЕЦЕССИЯ ЗАРЯЖЕННОГО ВОЛЧКА В МАГНИТНОМ ПОЛЕ

Рассмотрим вращающееся вокруг собственной оси заряженное тело, помещенное во внешнее магнитное поле $\mathbf{H}$ (рис. 9.1, А). Таким телом может быть, например, протон. Движение заряда во вращающемся теле приводит к появлению электрического тока. Этот циркулирующий ток в свою очередь порождает магнитный момент μ_m , который взаимодействует с $\mathbf{H}$. Взаимодействие выражается в появлении вращающего момента $\boldsymbol{\tau} = \mu_m \times \mathbf{H}$, который стремится изменить момент количества движения $\mathbf{L}$ заряженного тела. Основное уравнение электромагнитной теории, связывающее $\mathbf{L}$ и $\boldsymbol{\tau}$, имеет вид

$$d\mathbf{L}/dt = \boldsymbol{\tau} = \mu_m \times \mathbf{H} \quad (9.1)$$

Следовательно, $\boldsymbol{\tau}$ и $d\mathbf{L}$ направлены под прямым углом к μ_m и к $\mathbf{H}$ (рис. 9.1, Б).

Чтобы разобраться в движении заряженного волчка, мы должны найти соотношение между $d\mathbf{L}/dt$, с одной стороны, и $\mathbf{L}$ и $\mathbf{H}$, а не μ_m и $\mathbf{H}$ — с другой. Воспользуемся для этой цели следующим определением (в электромагнитных единицах) магнитного момента μ_m (см. Дополнение 9.1):

$$\mu_m = (1/2) \int \mathbf{r} \times \mathbf{j} dV \quad (9.2)$$

где $\mathbf{r}$ — вектор, проведенный из фиксированной точки тела в середину элемента объема dV , а $\mathbf{j}$ — плотность тока (заряд, протекающий за единицу времени через единичную площадь). Интеграл в (9.2) берется по всему объему тела. Плотность тока $\mathbf{j}$ может быть записана в виде

$$\mathbf{j} = (ze/m)\rho\mathbf{v} \quad (9.3)$$

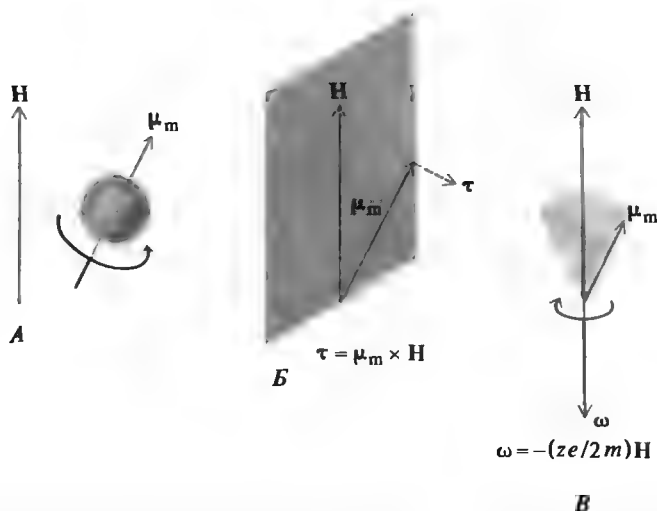


РИС. 9.1. Заряженный волчок в магнитном поле для случая $ze > 0$. А. Заряженное вращающееся тело, обладающее магнитным моментом μ_m , помещенное в магнитное поле $\mathbf{H}$. Б. Тело испытывает действие вращающего момента $\boldsymbol{\tau} = \mu_m \times \mathbf{H}$. В. Вращающий момент вызывает угловую прецессию, которая определяется вектором угловой скорости $\boldsymbol{\omega} = -(ze/2m)\mathbf{H}$.

где ze/m — отношение заряда к массе, ρ — плотность в объеме dV , а $\mathbf{v}$ — скорость элемента dV . Подставляя выражение (9.3) в уравнение (9.2), получим

$$\boldsymbol{\mu}_m = (ze/2m) \int \mathbf{r} \times \rho \mathbf{v} dV \quad (9.4)$$

Интеграл в уравнении (9.4) является по определению полным моментом количества движения $\mathbf{L}$ вращающегося тела, и, значит,

$$\boldsymbol{\mu}_m = (ze/2m)\mathbf{L} \quad (9.5)$$

Таким образом, между $\boldsymbol{\mu}_m$ и $\mathbf{L}$ имеется прямая и простая связь. Подставив (9.5) в (9.1), получим

$$d\mathbf{L}/dt = \mathbf{L} \times (ze/2m)\mathbf{H} \quad (9.6)$$

Это — уравнение движения постоянного вектора $\mathbf{L}$, вращающегося относительно направления поля $\mathbf{H}$ с угловой скоростью $\boldsymbol{\omega} = -(ze/2m)\mathbf{H}$. Уравнение (9.6), следовательно, приобретает вид

$$d\mathbf{L}/dt = \mathbf{L} \times (ze/2m)\mathbf{H} = -\mathbf{L} \times \boldsymbol{\omega} \quad (9.7)$$

Согласно (9.1) и (9.7), изменение момента количества движения $d\mathbf{L}$, обусловленное взаимодействием между $\boldsymbol{\mu}_m$ и $\mathbf{H}$, направлено перпендикулярно как $\mathbf{L}$, так и $\mathbf{H}$. Такое изменение $\mathbf{L}$ эквивалентно прецессионному движению с угловой скоростью $\boldsymbol{\omega}$ вокруг направления поля $\mathbf{H}$ (рис. 9.1, В). При $ze > 0$ прецессия направлена по часовой стрелке (если смотреть вдоль $\boldsymbol{\omega}$; направление $\boldsymbol{\omega}$ обратно по отношению к $\mathbf{H}$, и по правилу правой руки получается вращение по часовой стрелке); при $ze < 0$ прецессия происходит против часовой стрелки. Рассмотренное прецессионное движение известно как *ларморова прецессия*, а частота прецессии $\omega_0 = |\boldsymbol{\omega}|$ — как ларморова частота.

10

Дополнение 9.1

МАГНИТНЫЙ МОМЕНТ

Уравнение (9.2) обобщает простое выражение элементарной физики для магнитного момента проволочной рамки площади A , по которой течет ток I . В этом случае магнитный момент определяется как $\boldsymbol{\mu}_m = IA\mathbf{e}_\perp$, где $\mathbf{e}_\perp$ — единичный вектор, перпендикулярный плоскости рамки с током (направление выбирается в соответствии с правилом правой руки). Чтобы показать, что уравнение (9.2) приводит к этому соотношению, рассмотрим круговую рамку радиуса r , охватывающую площадь A' , по которой ток течет против часовой стрелки (см. рисунок). (Напомним, что если ток направлен



против часовой стрелки, то на самом деле поток электронов течет по часовой стрелке.) Тогда вектор $\mathbf{r} \times \mathbf{j}$ направлен перпендикулярно (к читателю) плоскости рисунка; это определяет направление $\mathbf{e}_\perp$.

Величина J равна I/A' , а $dV = A' ds = A' r d\theta$. Подставляя эти соотношения в уравнение (9.2), получаем

$$\begin{aligned}\mu_m &= (1/2)\hat{e}_\perp \int_0^{2\pi} r(I/A')A'r d\theta \\ &= I\pi r^2 \hat{e}_\perp = IA\hat{e}_\perp\end{aligned}$$

где $A = \pi r^2$.

МАГНИТНЫЙ МОМЕНТ ЯДЕР

Множитель $ze/2m$ представляет собой отношение магнитного момента и момента количества движения и носит название *гиромангнитного отношения*. В атомном масштабе момент количества движения квантуется в единицах $\hbar$. Таким образом, магнитный момент, скажем электрона, должен квантоваться в единицах $e\hbar/2m_e$ (где m_e — масса электрона). Эта фундаментальная единица известна под названием магнетона Бора (β_e); она равна $9,27 \cdot 10^{-21}$ эрг · Гс⁻¹. Однако квантовомеханическое рассмотрение показывает, что отношение магнитного момента электрона к его моменту количества движения при вращении вокруг собственной оси (спину) следует умножить на величину g , так что уравнение (9.5) приобретает вид

$$\mu_m = -g\beta_e(L/\hbar) \quad (9.8)$$

где $g = 2,00232$ для свободного электрона.

Аналогичное выражение связывает ядерный магнитный момент и ядерный спин:

$$\mu_m = g_n\beta_n(L/\hbar) \quad (9.9)$$

g_n называется ядерным g -фактором, а $\beta_n = e\hbar/2m_p$ (где m_p — масса протона). Величина β_n носит название ядерного магнетона; она равна $5,05 \cdot 10^{-24}$ эрг · Гс⁻¹. Уравнение (9.9) обычно записывают в более простой форме:

$$\mu_m = \gamma L \quad (9.10)$$

где $\gamma = g_n\beta_n/\hbar$ — гиромангнитное отношение. Этот параметр может быть положительным или отрицательным в зависимости от типа ядра. Таким образом, магнитный момент ядра может быть направлен как в ту же сторону, что L , так и в противоположную. Для электрона $\gamma = -g\beta_e/\hbar$, и μ_m направлен противоположно L .

Уравнение (9.10) аналогично уравнению (9.5). Подставляя (9.10) в (9.1), получим

$$d\mu_m/dt = \mu_m \times \gamma \mathbf{H} \quad (9.11)$$

где $\gamma \mathbf{H} = \omega$ — угловая скорость прецессии. Это соотношение будет использовано в разд. 9.3, где мы рассмотрим уравнения Блоха.

Момент количества движения протона характеризуется спиновым квантовым числом $I = 1/2$; таким же квантовым числом обладает нейтрон. В случае ядер, больших, чем ядро атома водорода, моменты количества движения отдельных нейтронов и протонов, составляющих ядро, складываются и дают тот или иной (в зависимости от конкретного случая) суммарный момент, для которого I может быть целым, полуцелым или равным нулю. Можно показать, что значение $I = 0$ отвечает ядрам с четным массовым числом и четным атомным номером (например, ^{12}C и ^{16}O); полуцелые I отвечают ядрам с нечетным массовым числом (например, ^1H и ^{19}F), а целые — ядрам с нечетным атомным но-

мером и четным массовым числом (таким, как ^2H и ^{14}N).

Момент количества движения L определяется выражением

$$L = \hbar[I(I + 1)]^{1/2} \quad (9.12)$$

Из (9.10) следует, что магнитный момент

$$\mu_m = \gamma \hbar[I(I + 1)]^{1/2} \quad (9.13)$$

так что ядра с $I = 0$ не обладают магнитным моментом. В табл. 9.1 приведены значения I , μ_m (в единицах β_n), γ и ларморовой частоты (ω_0) для некоторых ядер. Здесь же даны относительное содержание этих ядер в природных соединениях и относительная магнитная чувствительность (последняя будет кратко рассмотрена ниже).

Наиболее распространенными в биологических системах являются ядра ^1H , ^{12}C , ^{16}O , ^{14}N , ^{31}P и ^{32}S . Из них ^{12}C , ^{16}O и ^{32}S не представляют интереса с точки зрения ЯМР, так как они не обладают магнитным моментом. Ядро ^{14}N (как и всякое другое ядро с $I > 1/2$) обладает электрическим квадрупольным моментом (см. Дополнение 5.1), но из-за быстрых переходов его с одного квадрупольного уровня на другой времена жизни магнитных ядерных состояний (см. ниже) оказываются много меньше, чем для ядер с $I = 1/2$. При таких малых временах жизни (как у ядер с $I > 1/2$) спектральные линии переходов между магнитными состояниями сильно уширяются, что затрудняет их регистрацию. Таким образом, единственными ядрами в биологических объектах, к которым применим метод ЯМР, оказываются ^1H и ^{31}P . При этом ядра ^1H широко распространены фактически во всех биологических системах, в то время как ^{31}P встречается главным образом в нуклеиновых кислотах и фосфолипидах. Кроме того, магнитная чувствительность для ^1H значительно выше, чем для ^{31}P .

Существуют специальные методики, позволяющие регистрировать спектры ЯМР и других ядер, а не только ^1H и ^{31}P . Например, при помощи изотопного обогащения ста-

Таблица 9.1

МАГНИТНЫЕ СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ ЯДЕР ¹⁾

Ядро	Z	I	μ_m/β_n	γ , рад·Гс ⁻¹ ·с ⁻¹	$\omega_0/2\pi$, МГц/10 ⁴ Гс	Относительное содержание в природных соединениях, %	Относительная чувствительность ²⁾
^1H	1	1/2	4,84	26,753	42,6	99,98	1,000
^2H	1	1	1,21	4,107	6,5	0,016	0,0096
^{12}C	6	0	-	-	-	98,89	-
^{13}C	6	1/2	1,22	6,728	10,7	1,11	0,016
^{14}N	7	1	0,57	1,934	3,1	99,64	0,0010
^{16}O	8	0	-	-	-	99,76	-
^{19}F	9	1/2	4,55	25,179	40,1	100	0,834
^{31}P	15	1/2	1,96	10,840	17,2	100	0,066
^{32}S	16	0	-	-	-	95,06	-

¹⁾ Roberts J.D. Nuclear Magnetic Resonance, New York, McGraw-Hill, 1959; Lynden-Bell R.M., Harris R.K. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, London, Thomas Nelson, 1969.

²⁾ Относительная чувствительность приведена для одинакового числа ядер в одинаковом магнитном поле.

новится возможным исследовать ^{13}C -центры (для которых $I = \frac{1}{2}$). (В природных соединениях содержание ^{13}C составляет лишь 1%. Такой дефицит, а также относительно низкая магнитная чувствительность затрудняют проведение исследований без специального обогащения.) Иногда в качестве специфического к определенным центрам зонда используется ^{19}F , при помощи которого можно получить информацию о магнитном окружении данного центра. ^{19}F особенно подходит для этой цели в силу своей высокой магнитной чувствительности (из-за относительно большой величины магнитного момента).

ОГРАНИЧЕНИЯ, НАЛАГАЕМЫЕ НА ЯДЕРНЫЕ МАГНИТНЫЕ МОМЕНТЫ

Во внешнем магнитном поле проекции магнитных моментов ядер на направление поля могут иметь лишь некоторые, вполне определенные значения. Во внешнем поле $\mathbf{H}$ энергия E взаимодействия магнитного момента μ_m и $\mathbf{H}$ составляет

$$E = -\mu_m \cdot \mathbf{H} \quad (9.14)$$

Это означает, что самой низкой энергии отвечает параллельная ориентация поля (направленного вдоль оси z) и магнитного момента. Согласно квантовой механике, проекции μ_{mz} момента μ_m на направление магнитного поля могут принимать лишь следующие значения:

$$\mu_{mz} = m_I \gamma \hbar \quad (9.15)$$

где $m_I = I, I - 1, I - 2, \dots, I - 2I$. Для ^1H разрешенными значениями m_I являются $m_I = +\frac{1}{2}, -\frac{1}{2}$. Таким образом, возможны лишь две ориентации относительно поля:

$$\begin{aligned} E &= -\mu_m \cdot \mathbf{H} = -m_I \gamma \hbar H \\ &= -(1/2) \gamma \hbar H \quad \text{для } m_I = +1/2 \\ &= +(1/2) \gamma \hbar H \quad \text{для } m_I = -1/2 \end{aligned} \quad (9.16)$$

Разность энергий для состояний с этими двумя ориентациями равна $\Delta E = -\gamma \hbar H$. Число ядер с той или с иной ориентацией определяется бoльцмановским экспоненциальным множителем $e^{-\Delta E/kT}$. В поле величиной 10 000 Гс отношение числа протонов, обладающих параллельной полю проекцией μ_m , к числу протонов с антипараллельной проекцией составляет при 300 К 1,000007. Таким образом, при комнатной температуре энергия взаимодействия магнитных моментов с внешним полем мала по сравнению с разупорядочивающей тепловой энергией; наблюдается лишь ничтожный избыток ядер, расположенных «вдоль» магнитного поля. Однако этот маленький избыток весьма существен для регистрации поглощения ЯМР. Если бы оба этих состояния были одинаково заселены, то отсутствовала какая бы то ни было намагниченность образца. В этом случае (как мы увидим позже) энергия не сможет поглощаться. Кроме того, ясно, что магнитная чувствительность ядер зависит от взаимного расположения их уровней энергии; разность энергий в свою очередь влияет на величину бoльцмановского множителя, который определяет различия в заселенности уровней. Поскольку разность энергий определяется величиной γ , то очевидно, что большее значение γ отвечает большему различию заселенностей и большей чувствительности (табл. 9.1). Дальнейшее обсуждение вопроса об относительной чувствительности можно найти в Дополнении 9.2.

Дополнение 9.2

ОТНОСИТЕЛЬНАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Выражение (9.30) задает амплитуду сигнала поглощения при $I = 1/2$ (например, для протона). При резонансе ($\omega = \omega_0$) и при условии, что $\gamma^2 H_{xy}^2 T_1 T_2 \ll 1$, амплитуда сигнала на единицу магнитного поля составляет

$$\text{Сигнал } /H_z = \text{const } N(\mu_{mz}^2/kT)\omega_0 H_{xy} T_2 \quad \text{для } I = 1/2$$

где мы использовали равенство $\omega_0 = \gamma H_z$. (Резонанс достигается при помощи изменения H_z до тех пор, пока частота прецессии не совпадет с частотой прибора ω_0 , как это описано в тексте.) В случае ядер с $I = 1/2$ имеем $\mu_{mz}^2 = (1/4)\gamma^2 \hbar^2$. Подставляя это соотношение в предшествующее выражение и поменяв величины, относящиеся к протону, индексом p , получим выражение для относительной чувствительности ядер с $I = 1/2$ при заданных T , ω_0 , H_{xy} и T_2 :

$$\text{Относительная чувствительность} = (\text{Сигнал}/H_z) / (\text{Сигнал}/H_z)_p = \gamma^3 / \gamma_p^3$$

Легко показать, что для ядер с $I = 1$

$$\text{Относительная чувствительность} = (\text{Сигнал}/H_z) / (\text{Сигнал}/H_z)_p = (3/4)(\gamma^3 / \gamma_p^3)$$

Эти выражения дают величины относительной чувствительности, значения которой приведены в табл. 9.1.

ФИЗИЧЕСКАЯ ОСНОВА ЭКСПЕРИМЕНТА ПО ЯМР: КЛАССИЧЕСКАЯ АНАЛОГИЯ

Рассмотрим совокупность ядер, каждое из которых обладает магнитным моментом μ_m (рис. 9.2.). В отсутствие внешнего поля эти ядра и их магнитные моменты имеют хаотическую ориентацию. Предположим теперь, что включается поле H , направленное вдоль оси z . При этом ядра будут стремиться ориентироваться вдоль поля и прецессировать вокруг оси z с ларморовой частотой ω_0 . На процесс ориентации накладывается хаотическое движение ядер, что приводит к установлению больцмановского распределения ядер по энергиям магнитного взаимодействия.

В результате существования преимущественной ориентации вдоль оси z появляется суммарная намагниченность M_z . Она представляет собой просто сумму проекций на ось z магнитных моментов отдельных ядер. Из-за наличия хаотического движения возрастание намагниченности во времени с момента включения поля H_z описывается простым выражением, характерным для реакций первого порядка:

$$M_z = \bar{M}_z(1 - e^{-t/T_1}) \quad (9.17)$$

где $\bar{M}_z$ — равновесное значение намагниченности, а T_1 — *время продольной релаксации* («продольной» по отношению к направлению поля). Следовательно, T_1 служит мерой времени, необходимого для того, чтобы в результате хаотического движения установилась равновесная величина z -компоненты намагниченности, $\bar{M}_z$.

Полная намагниченность образца равна $M = M_z$. Ее x - и y -компоненты, M_x и M_y , равны нулю, поскольку вдоль этих осей ядра ориентированы случайным образом (рис. 9.2).

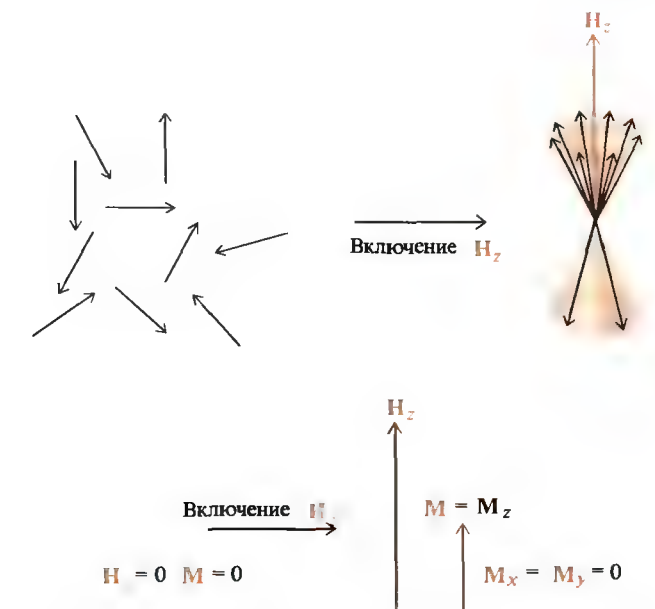


РИС. 9.2. Хаотически ориентированные ядра во внешнем магнитном поле H_z ориентируются, что приводит к появлению суммарной намагниченности M_z .

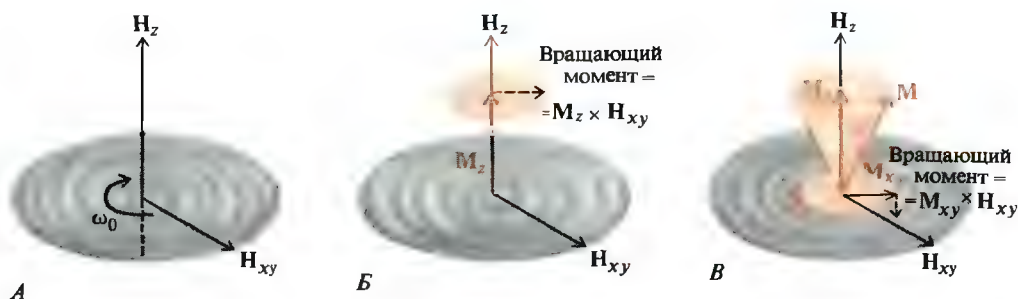


РИС. 9.3. Действие поля H_{xy} на M_z и M_{xy} . А. Основное поле H_z и осциллирующее поле H_{xy} . Б. Вращающий момент $M_z \times H_{xy}$ поворачивает вектор M по направлению к плоскости $x-y$, порождая составляющую M_{xy} . В. Вращающий момент $M_{xy} \times H_{xy}$ стремится повернуть вектор M_z в обратном направлении.

Следовательно, ядра прецессируют вокруг оси z с частотой ω_0 , но при этом какая-либо согласованность между фазами отдельных прецессий отсутствует. Вообразим теперь, что мы включили поле H_{xy} , причем вектор H_{xy} вращается с частотой ω_0 в плоскости $x-y$ в том же направлении, что и прецессирующие ядра (рис. 9.3, А). Это поле будет создавать вращающий момент $\tau = M_z \times H_{xy}$, стремящийся отклонить M от направления оси z и приводящий к появлению ненулевой проекции M_{xy} на плоскость $x-y$. Как показано на рис. 9.3, Б, результирующая компонента M_{xy} будет сдвинута по фазе на 90° по отношению к H_{xy} .

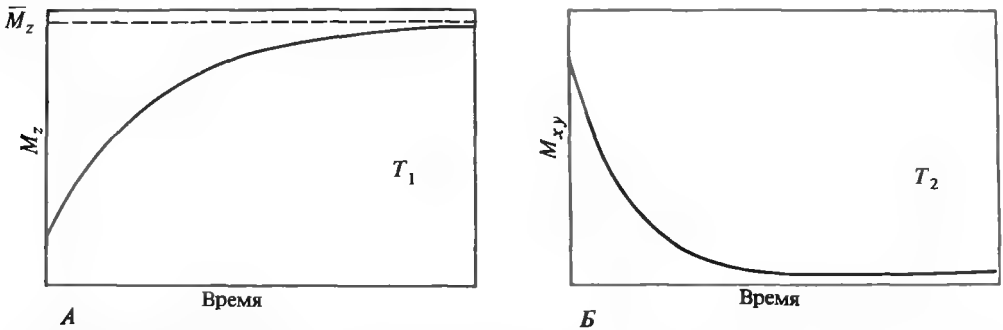


РИС. 9.4. Времена релаксации. А. Время T_1 характеризует продольную релаксацию. Б. Время T_2 характеризует поперечную релаксацию.

При появлении компоненты M_{xy} в игру вступает еще один вращающий момент, $\tau = M_{xy} \times H_{xy}$ (рис. 9.3,Б). Этот момент стремится перевести M в антипараллельную по отношению к H_z ориентацию. Такое отклонение соответствует увеличению (поглощению) энергии. Следовательно, проекция M_z становится меньше своего равновесного значения M_z .

Предположим теперь, что поле H_{xy} резко выключается. Компонента M_z самопроизвольно возвратится к своему равновесному значению M_z в силу теплового движения; этот процесс характеризуется временем релаксации T_1 (рис. 9.4,А). Что касается M_{xy} , то она должна будет со временем обратиться в нуль, поскольку в равновесии какая бы то ни было преимущественная ориентация вдоль осей x и y отсутствует. Эта релаксация также происходит самопроизвольно и является процессом первого порядка с характерным временем T_2 , таким, что $M_{xy} = (M_{xy})_0 e^{-t/T_2}$, где t — время с момента выключения H_{xy} , а $(M_{xy})_0$ — значение M_{xy} в этот момент времени (рис. 9.4,Б).

Параметр T_2 называется *временем поперечной релаксации*. Разупорядочивающие процессы (аналогичные тем, которые способствуют восстановлению равновесного значения M_z за времена порядка T_1) приводят к исчезновению M_{xy} за счет разупорядочивания поперечных компонент. Однако имеются и дополнительные процессы, влияющие на поперечную релаксацию, которые не оказывают влияния на продольную ориентацию M . Следовательно, T_2 никогда не может быть больше T_1 .

Вернемся теперь к ситуации, изображенной на рис. 9.3,Б. При включенном поле H_z и наличии H_{xy} , вращающемся с ларморовой частотой ω_0 , вектор M_{xy} отстает по фазе на 90° от H_{xy} , существует вращающий момент $\tau = M_{xy} \times H_{xy}$, стремящийся перевести намагниченность в антипараллельную по отношению к оси z ориентацию и тем самым уменьшить M_z , что приводит к поглощению энергии. Однако при этом M_z непрерывно и самопроизвольно стремится принять равновесное значение M_z , что сопровождается разупорядочиванием поперечных компонент намагниченности отдельных ядер и приближением M_{xy} к своему равновесному значению, равному нулю. Пока эти релаксационные процессы происходят с достаточной эффективностью, наблюдается непрерывное поглощение энергии, так как действие H_{xy} на M постоянно «подправляется» релаксационными процессами.

Следует отметить, что поглощение энергии происходит, когда H_{xy} вращается с частотой, равной или близкой к ларморовой частоте ω_0 . Для протонов разность энергий ΔE двух магнитных состояний равна [см. уравнение (9.16)]

$$\Delta E = \gamma \hbar H = \quad \cdot \quad (9.18 \text{ а})$$

$$= \hbar \omega_0 = \hbar \nu_0 \quad (9.18 \text{ б})$$

где $2\pi\nu_0 = \omega_0$. Таким образом, поле $\mathbf{H}_{xy}$ должно осциллировать с частотой, которая отвечает разности энергий ΔE двух соседних магнитных состояний. С классической точки зрения это можно объяснить тем, что для генерации сигнала ЯМР необходимо поддерживать сдвиг по фазе в 90° между $\mathbf{H}_{xy}$ и $\mathbf{M}_{xy}$. Этот сдвиг удастся сохранять, если частота колебаний $\mathbf{H}_{xy}$ близка к ω_0 . Пусть теперь ω значительно отличается от ω_0 . В момент $t = 0$ благодаря действию $\mathbf{H}_{xy}$ на $\mathbf{M}_z$ создается момент сил, который порождает проекцию $\mathbf{M}_{xy}^{(0)}$. В этот начальный момент времени разность фаз между $\mathbf{H}_{xy}$ и $\mathbf{M}_{xy}^{(0)}$ составляет 90° , но по прошествии времени Δt она становится равной $90^\circ + (\omega - \omega_0)\Delta t$. Более того, $\mathbf{H}_{xy}$ продолжает непрерывно действовать на $\mathbf{M}_z$, так что, например, при $t = \Delta t$ это приводит к появлению составляющей $\mathbf{M}_{xy}^{(1)}$, которая сдвинута относительно $\mathbf{H}_{xy}$ на 90° . В этот момент $\mathbf{M}_{xy}^{(0)}$ и $\mathbf{M}_{xy}^{(1)}$ оказываются сдвинуты по фазе на $(\omega - \omega_0)\Delta t$. Продолжая эти рассуждения, мы увидим, что фазовая когерентность утрачивается, $\mathbf{M}_{xy}$ обращается в ноль и в результате $\mathbf{H}_{xy}$ теряет способность влиять на изменение намагниченности вдоль оси z . Энергия более не поглощается, поскольку равновесное значение z -составляющей намагниченности $\mathbf{M}$ уже не подвергается возмущающему действию.

На практике действие $\mathbf{H}_{xy}$ на $\mathbf{M}$ обычно осуществляется при помощи изменений y -составляющей ($\mathbf{M}_y$) намагниченности. ЯМР-спектрометр схематически изображен на рис. 9.5. Основное поле вдоль оси z создают большим магнитом, который снабжен вспомогательным источником переменного поля, называемого полем развертки, а источником осциллирующего поля служит катушка, расположенная вдоль оси x ; приемная катушка располагается вдоль оси y . Согласно сказанному выше, частота прецессии вокруг оси z равна $\omega_0 = \gamma H_z$. Следовательно, ω_0 можно изменять, варьируя H_z при помощи поля развертки — метод, часто используемый для достижения резонанса в экспериментах по ЯМР. Поле $\mathbf{H}_{xy}$ осциллирует с постоянной частотой ω , задаваемой прибором, а H_z меняется до тех пор, пока ω_0 не совпадет с ω . В этот момент наблюдается резонанс, и, как мы увидим позже, вдоль оси y регистрируется максимальное поглощение. Резонанс может быть достигнут и другим путем — с помощью изменения частоты осциллирующего поля.

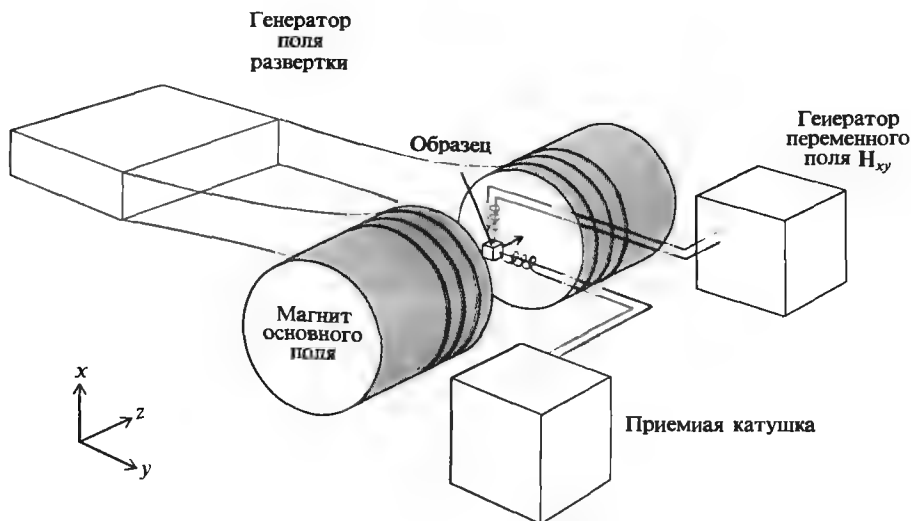


РИС. 9.5. Схематическое изображение ЯМР-спектрометра.

Этот качественный анализ можно перевести на количественный уровень с тем, чтобы глубже понять основные особенности ЯМР. Мы проиллюстрируем возможность такого перехода, рассмотрев простое феноменологическое описание, известное под названием *уравнений Блоха*.

9.3. Уравнения Блоха

Поскольку $\mathbf{M}$ представляет собой просто векторную сумму магнитных моментов μ_m отдельных ядер, можно [по аналогии с уравнением (9.11)] записать

$$d\mathbf{M}/dt = \mathbf{M} \times \gamma \mathbf{H} \quad (9.19)$$

где $\mathbf{H} = \mathbf{H}_z + \mathbf{H}_{xy}$ (причем $\mathbf{H} \gg \mathbf{H}_{xy}$). Однако это уравнение классической физики необходимо уточнить с тем, чтобы описать процесс установления равновесного распределения составляющих магнитных моментов отдельных ядер за счет процессов продольной и поперечной релаксации. Блох предположил, что всякое отклонение от равновесного значения z -составляющей намагниченности приводит к релаксационным процессам первого порядка, возвращающим систему к равновесию и описываемым уравнением (9.17), которое можно записать также в дифференциальной форме

$$dM_z/dt = -(M_z - \bar{M}_z)/T_1 \quad (9.20)$$

Рассмотрим теперь поперечную релаксацию. Как уже отмечалось, если внешнее поле направлено строго вдоль оси z , среднее значение компоненты M_{xy} равно нулю. Всякое отклонение M_x или M_y от нуля будет сопровождаться релаксацией системы к состоянию, в котором эти составляющие равны нулю, причем скорость этого процесса первого порядка будет определяться величиной $1/T_2$. Следовательно, можно записать

$$dM_x/dt = -M_x/T_2 \quad (9.21a)$$

$$dM_y/dt = -M_y/T_2 \quad (9.21b)$$

Объединяя уравнения (9.20) и (9.21) с уравнением (9.19), мы получим полное выражение для $d\mathbf{M}/dt$:

$$d\mathbf{M}/dt = \mathbf{M} \times \gamma \mathbf{H} - (M_x/T_2)\hat{\mathbf{i}} - (M_y/T_2)\hat{\mathbf{j}} - [(M_z - \bar{M}_z)/T_1]\hat{\mathbf{k}} \quad (9.22)$$

где $\hat{\mathbf{i}}, \hat{\mathbf{j}}, \hat{\mathbf{k}}$ — единичные векторы, направленные вдоль осей x, y и z соответственно. Составляющие вектора магнитного поля $\mathbf{H}$ — это H_z и совершающий круговое движение вектор $\mathbf{H}_{xy}$. Считая, что $\mathbf{H}_{xy}$ вращается по часовой стрелке, получим

$$\mathbf{H}_{xy} = H_x\hat{\mathbf{i}} + H_y\hat{\mathbf{j}} \quad (9.23)$$

где $H_x = H_{xy} \cos \omega t$, $H_y = -H_{xy} \sin \omega t$. Выражение для $d\mathbf{M}/dt$ можно представить в виде

$$d\mathbf{M}/dt = (dM_x/dt)\hat{\mathbf{i}} + (dM_y/dt)\hat{\mathbf{j}} + (dM_z/dt)\hat{\mathbf{k}} \quad (9.24)$$

Записывая векторное произведение в уравнении (9.22) в виде отдельных компонент, мы получим выражения, известные как уравнения Блоха:

$$dM_x/dt = \gamma M_y H_z + \gamma M_z H_{xy} \sin \omega t - (M_x/T_2) \quad (9.25a)$$

$$dM_y/dt = -\gamma M_x H_z + \gamma M_z H_{xy} \cos \omega t - (M_y/T_2) \quad (9.25б)$$

$$dM_z/dt = -\gamma M_x H_{xy} \sin \omega t - \gamma M_y H_{xy} \cos \omega t - [(M_z - \bar{M}_z)/T_1] \quad (9.25в)$$

Детально проанализировав уравнения Блоха, можно получить физическую картину взаимодействия каждой из составляющих магнитного поля с любой компонентой магнитного момента; это взаимодействие приводит к появлению вращающего момента, который в свою очередь изменяет компоненты $\mathbf{M}$. Заметим, что уравнения (9.25) в отсутствие внешних полей сводятся к уравнениям (9.20) и (9.21).

В ЯМР-спектрометре приемная катушка расположена вдоль оси y с тем, чтобы можно было регистрировать изменения M_y (рис. 9.5). Нас интересует вектор $\mathbf{M}_{xy} = M_x \hat{i} + M_y \hat{j}$, вращающийся в плоскости $x - y$. Этот вектор можно представить как сумму двух компонент, $\mathbf{u}$ и $\mathbf{v}$, где $\mathbf{u}$ находится в фазе с $\mathbf{H}_{xy}$, а $\mathbf{v}$ сдвинута по фазе на 90° (рис. 9.6). Из сказанного ранее (и из рис. 9.3) мы можем сделать вывод, что при резонансе ($\omega = \omega_0$) $\mathbf{v}$ представляет собой основную компоненту $\mathbf{M}_{xy}$. Единичным вектором в направлении $\mathbf{H}_{xy}$ является вектор $\hat{i} = \hat{i} \cos \omega t - \hat{j} \sin \omega t$, и, таким образом, $\mathbf{u} = \mathbf{M}_{xy} \cdot \hat{i}$, или

$$u = M_x \cos \omega t - M_y \sin \omega t \quad (9.26a)$$

а v определяется как

$$\begin{aligned} v &= M_x \cos(\omega + \pi/2)t - M_y \sin(\omega + \pi/2)t = \\ &= -M_x \sin \omega t - M_y \cos \omega t \end{aligned} \quad (9.26б)$$

Дифференцируя уравнения (9.26) и используя уравнения Блоха (9.25), получаем

$$du/dt = -(\omega_0 - \omega)v - u/T_2 \quad (9.27a)$$

$$dv/dt = (\omega_0 - \omega)u - v/T_2 - \gamma H_{xy} M_z. \quad (9.27б)$$

$$dM_z/dt = -(M_z - \bar{M}_z)/T_1 + \gamma H_{xy} v \quad (9.27в)$$

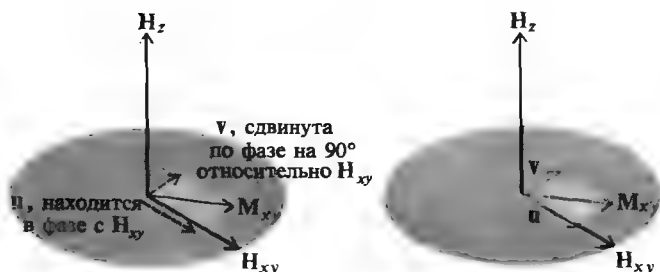


РИС. 9.6. Компоненты вектора $\mathbf{M}_{xy}$. Компонента $\mathbf{u}$ находится в фазе с $\mathbf{H}_{xy}$, а компонента $\mathbf{v}$ сдвинута на 90° .

где $\omega_0 = \gamma H_z$ — ларморова частота ¹⁾.

При фиксированной величине поля H_z и при резонансной частоте $\omega = \omega_0$ (или близких частотах) наблюдается стационарный сигнал. Это означает, что

$$du/dt = dv/dt = dM_z/dt = 0 \quad (9.28)$$

Применяя это условие стационарности к уравнениям (9.27), можно выразить u , v и M_z через известные величины:

$$M_z = \bar{M}_z [1 + T_2^2(\omega_0 - \omega)^2] / [1 + T_2^2(\omega_0 - \omega)^2 + \gamma^2 H_{xy}^2 T_1 T_2] \quad (9.29a)$$

$$u = \bar{M}_z \gamma H_{xy} (\omega_0 - \omega) T_2^2 / [1 + T_2^2(\omega_0 - \omega)^2 + \gamma^2 H_{xy}^2 T_1 T_2] \quad (9.29б)$$

$$v = -\bar{M}_z \gamma H_{xy} T_2 / [1 + T_2^2(\omega_0 - \omega)^2 + \gamma^2 H_{xy}^2 T_1 T_2] \quad (9.29в)$$

Заметим, что все параметры, входящие в правые части уравнений (9.29), известны. Например, $\bar{M}_z$ можно найти из распределения Больцмана.

Уравнения (9.29) оказываются чрезвычайно полезными для интерпретации экспериментальных данных. Заметим, что u обращается в нуль, когда $\omega_0 - \omega = 0$ (резонанс), и таким образом, M_{xy} , как мы и ожидали, полностью определяется компонентой v . Следовательно, вектор M_{xy} на 90° отстает по фазе от H_{xy} . В этом случае реализуется максимально возможный вращающий момент ($M_{xy} \times H_{xy}$), изменяющий проекцию M на направление поля (ось z). Изменение результирующего направления M по отношению к полю приводит к изменению энергии магнитного взаимодействия системы $M \cdot H_z$. Согласно уравнению (9.29в), величина v отрицательна (при $\gamma > 0$); в сочетании с условием стационарности, примененным к уравнению (9.27в), это означает, что разность ($M_z - \bar{M}_z$) также отрицательна. Таким образом, намагниченность M_z становится меньше своего равновесного значения, а это означает, что вектор M был повернут в сторону антипараллельной ориентации относительно H_z . Такой поворот отвечает увеличению (поглощению) энергии ядер. Эти результаты согласуются с качественными выводами, полученными при обсуждении экспериментов по ЯМР в разд. 9.2.

Ясно, что значение v определяет количество энергии, поглощаемой при изменении ориентации M_z по отношению к направлению поля. Мету величины v можно получить при сравнении разнящихся на 90° по фазе компонент H_{xy} и M_{xy} . Например, при резонансе (когда $u = 0$, а H_{xy} сдвинута на 90° по отношению к M_{xy}) составляющая H_x совпадает по фазе с M_y . Таким образом, помещая наш приемник вдоль оси y и измеряя опорный сигнал H_x , мы получим меру величины v , измеряя ток, индуцированный составляющей M_y , который в приемнике накладывается на опорный сигнал H_x . Ясно, что при $\omega = \omega_0$ амплитуда результирующего сигнала будет максимальной, поскольку H_x и M_y находятся в фазе; когда же $\omega \neq \omega_0$, H_x и M_y находятся не в фазе и результирующая амплитуда будет меньше. Это один способ получения меры величины v . Другой заключается в установлении фазовых соотношений между H_y и M_x .

Наблюдаемая интенсивность сигнала поглощения пропорциональна величине v . На рис. 9.7 приведен типичный сигнал поглощения; это симметричный пик с максимумом

¹⁾ В уравнении (9.11) и далее мы определяли ω как $\omega = -\gamma H$, т.е. считали, что для положительных γ (а это имеет место для большинства представляющих интерес ядер; см. табл. 9.1) ω направлена противоположно H . Как показано на рис. 9.1, если направление поля совпадает с положительным направлением оси z , то ω направлена в противоположную сторону, что отвечает вращению по часовой стрелке. Однако при записи уравнений Блоха мы выбрали за положительное направление вращение по часовой стрелке, и, следовательно, скалярная величина ω_0 определяется как $\omega_0 = \gamma H_z$.

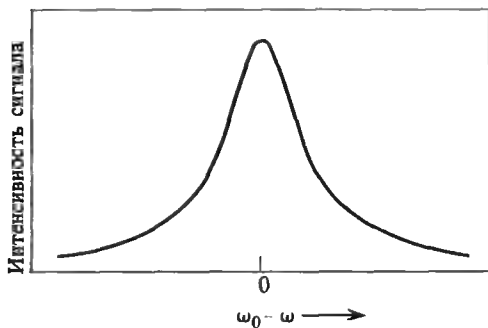


РИС. 9.7. Сигнал поглощения (ν -мода, или поглощательная мода).

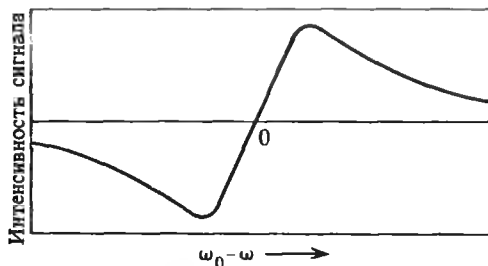


РИС. 9.8. Сигнал дисперсии (μ -мода, или дисперсионная мода).

при $\omega_0 - \omega = 0$. Аналогичным образом можно было бы измерить при помощи подходящего устройства μ -моду (сигнал дисперсии), описываемую уравнением (9.29б) (рис. 9.8.). Эта кривая также симметрична относительно точки $\omega_0 - \omega = 0$, где компонента намагниченности, находящаяся в фазе с H_{xy} , обращается в нуль.

Рассмотрим теперь некоторые частные случаи уравнений (9.29) и подробнее проанализируем смысл величин T_1 и T_2 .

9.4. Важные следствия, вытекающие из уравнений Блоха

ИНТЕНСИВНОСТЬ СИГНАЛА

Согласно нашим представлениям, сигнал поглощения должен зависеть от ν . Напряжение, индуцируемое в приемной катушке, расположенной вдоль оси y , пропорционально скорости изменения магнитного момента вдоль этой оси. При определенных условиях эта пропорциональность выражается следующим образом:

$$\text{Сигнал} \propto \omega_0 \nu = \gamma H_z \nu$$

(см. Pople et al., 1959). Заметим, что согласно уравнению (9.29в), ν зависит от M_z . Для ядер с $I = \frac{1}{2}$ M_z можно представить как $M_z = (\bar{N}_{\frac{1}{2}} - N_{-\frac{1}{2}})\mu_{mz}$, где $N_{\frac{1}{2}}$ и $\bar{N}_{-\frac{1}{2}}$ — равновесное число ядер, находящихся в состояниях с проекцией ядерного спина $+\frac{1}{2}$ и $-\frac{1}{2}$ соответственно, μ_{mz} — проекция магнитного момента на направление поля, определяемая уравнением (9.15). Согласно больцмановскому распределению (и в соответствии с тем, что обычно $\mu_{mz} H_z / kT \ll 1$), получаем

$$\begin{aligned}\bar{M}_z &= N(e^{+\mu_{mz}H_z/kT} - e^{-\mu_{mz}H_z/kT})\mu_{mz} \\ &= 2(H_z\mu_{mz}^2/kT)N\end{aligned}$$

где N — полное число ядер, обладающих магнитным моментом. Используя это выражение для $\bar{M}_z$ и подставляя v из уравнения (9.29в), получаем

$$\text{Сигнал} = \text{const } N \left(\frac{\mu_{mz}^2 H_z^2}{kT} \right) \left(\frac{\gamma^2 H_{xy} T_2}{1 + T_2^2 (\omega_0 - \omega)^2 + \gamma^2 H_{xy}^2 T_1 T_2} \right) \quad (9.30)$$

Аналогичные выражения можно получить для ядер с другими значениями I ; эти выражения будут отличаться лишь постоянным множителем.

Из уравнения (9.30) следует, что интенсивность сигнала возрастает как квадрат величины H_z . Это легко понять из вывода уравнения. Обратная пропорциональность сигнала температуре есть просто следствие уменьшения степени ориентации ядер вдоль поля, которое обусловлено увеличением разупорядочивающего движения при повышении температуры. Как будет отмечено ниже, интенсивность и форма сигнала зависят также от T_1 и T_2 .

Наконец, очень важно отметить, что интенсивность сигнала поглощения прямо пропорциональна суммарному числу ядер, обладающих магнитным моментом (N), в результате чего интенсивность сигнала ЯМР оказывается прямо связанной с концентрацией поглощающих ядер. Практическое значение этой пропорциональности очевидно.

БОЛЬШИЕ ВРЕМЕНА ПРОДОЛЬНОЙ РЕЛАКСАЦИИ (T_1)

Рассмотрим интенсивность сигнала в пике поглощения ($\omega = \omega_0$), когда T_1 велико. В этом случае уравнение (9.30) сводится к

$$\text{Сигнал} = k/T_1$$

(где k — постоянная), т.е. сигнал определяется величиной T_1 . Аналогично из уравнения (9.29а) видно, что при очень больших T_1 M_z уменьшается. В таких случаях говорят, что система близка к *насыщению*. Вращающий момент, связанный с действием H_{xy} на M_z , уже перевел достаточное количество ядер в антипараллельное состояние, так что M_z фактически равна нулю. Из-за того, что T_1 велико, разупорядочивающие процессы, под действием которых устанавливается равновесное значение M_z , оказываются слишком медленными для того, чтобы скомпенсировать действие H_{xy} . Разумеется, с уменьшением M_z составляющая v , которая отстает по фазе на 90° от H_{xy} , также должна уменьшиться. В этом случае для того, чтобы получить достаточно интенсивный сигнал, приходится проводить эксперимент в нестационарных условиях.

ВЛИЯНИЕ ФЛУКТУИРУЮЩИХ ЛОКАЛЬНЫХ ПОЛЕЙ И ОКРУЖЕНИЯ НА T_1

Окружение ядер, свойства которых исследуют, обычно называют решеткой, а о T_1 часто говорят как о *времени спин-решеточной релаксации*. Релаксация продольной составляющей намагниченности к равновесному значению происходит под действием флуктуирующих магнитных полей в решетке. Это беспорядочно ориентированные поля с самыми разными частотами. Одна из этих частот обязательно совпадет с ларморовой частотой ω_0 исследуемых ядер, а проекция соответствующего поля на плоскость $x - y$ вызовет,

подобно H_{xy} , изменения z -компоненты вектора M .

Окружение ядер, т.е. решетка, сильно влияет на величину T_1 . В твердых телах, где движение молекул в значительной степени ограничено, большинство беспорядочно ориентированных магнитных полей имеет низкие частоты, которые могут быть все ниже ω_0 . В результате T_1 оказывается очень велико — иногда порядка часов. В жидкостях или газах, где молекулярное движение гораздо интенсивнее и спектр флуктуирующих локальных полей более широк, T_1 весьма мало. Например, для жидкостей во многих случаях $T_1 < 10$ с.

Можно ожидать, что в жидкостях величина T_1 будет зависеть от вязкости. На рис.9.9 приведен график зависимости T_1^{-1} от η . Заметим, что при некотором значении η T_1^{-1} достигает максимального значения, а затем падает. Такое поведение легко понять, рассматривая время корреляции τ_c , т.е. время, за которое намагниченность ансамбля ориентированных магнитных диполей уменьшится в e раз вследствие теплового движения. Для сфер радиуса r это время составляет¹⁾

$$\tau_c = 4\pi\eta r^3/3kT \quad (9.31)$$

где η — вязкость. Очевидно, что частотный спектр поперечных компонент флуктуирующих магнитных полей, порожденных ядрами решетки, будет иметь максимум вблизи частоты τ_c^{-1} . Следовательно, когда η принимает такое значение, что величина τ_c^{-1} ядер решетки становится сравнимой с ларморовой частотой прецессирующих ядер, возникает эффективное взаимодействие между поперечными компонентами флуктуирующих магнитных полей и прецессирующими ядерными магнитными моментами. В результате этого взаимодействия происходит обмен энергией между спиновой и решеточной системами, что ведет к установлению теплового равновесия. Когда вязкость становится иной, меня-

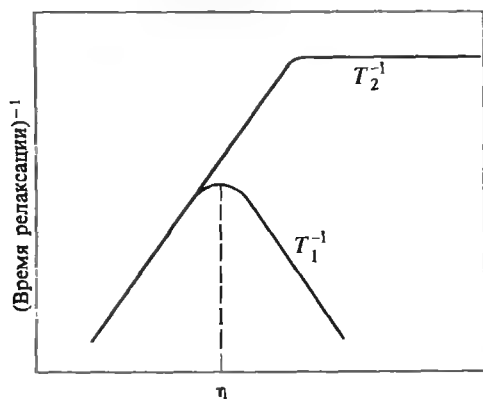


РИС. 9.9. Влияние вязкости η на времена релаксации T_1 и T_2 .

¹⁾ Уравнение (9.31) является приближенным. Более точное рассмотрение, которое учитывает микровязкость переориентирующихся молекул, предполагает введение в правую часть уравнения (9.31) множителя f . В предельном случае, когда переориентирующиеся молекулы значительно больше по размеру молекул растворителя, f становится близким к единице (для карбоксигемоглобина f составляет примерно 0,8).

Время вращательной корреляции для молекулы воды $\approx 10^{-12}$ с. Для белков с мол. массой от 50 000 до 100 000 τ_c лежит в интервале от 10^{-8} до 10^{-7} с.

Важно понимать, что τ_c для данного ядра может не совпадать с временем корреляции, характерным для всей молекулы. Например, отдельная группа в молекуле может обладать внутренним вращением, и, значит, времена корреляции для ядер этой группы будут меньше времени корреляции при переориентации всей молекулы как целого.

Понятие времени корреляции обсуждалось в гл. 8 [см., в частности, уравнение (8.73)].

ется и τ_c , так что пик частотного спектра смещается относительно ларморовой частоты спиновой системы. Эти изменения приводят к уменьшению эффективности обмена энергией и к увеличению времени T_1 .

ВЛИЯНИЕ T_1 и T_2 НА ШИРИНУ ЛИНИИ

Определим ширину линии $\Delta\omega_{1/2}$ через величину $\omega_0 - \omega = \pm \Delta\omega_{1/2}/2$, при которой сигнал уменьшается вдвое по сравнению со своим максимальным значением (рис. 9.10). Пользуясь уравнением (9.30), можно написать

$$\text{Сигнал} = \kappa T_2 / [1 + T_2^2(\omega_0 - \omega)^2 + \gamma^2 H_{xy}^2 T_1 T_2] \quad (9.32)$$

где κ — постоянная, включающая несколько параметров. Максимальная интенсивность сигнала дается выражением

$$\text{Сигнал}_{\max} = \kappa T_2 / (1 + \gamma^2 H_{xy}^2 T_1 T_2) \quad (9.33)$$

а величина, равная половине максимальной интенсивности, есть

$$\text{Сигнал}_{\max} / 2 = \kappa T_2 / [1 + T_2^2(\Delta\omega_{1/2}/2)^2 + \gamma^2 H_{xy}^2 T_1 T_2] \quad (9.34)$$

Таким образом, из уравнений (9.33) и (9.34) находим, что

$$T_2^2(\Delta\omega_{1/2}/2)^2 = 1 + \gamma^2 H_{xy}^2 T_1 T_2 \quad (9.35)$$

и

$$\Delta\omega_{1/2} = (2/T_2)(1 + \gamma^2 H_{xy}^2 T_1 T_2)^{1/2} \quad (9.36)$$

Видно, что при заданном T_1 ширина линии будет возрастать с уменьшением T_2 ; при фиксированном T_2 линия становится уже с уменьшением T_1 . Заметим также, что ширина линии зависит от H_{xy} , но не от H_z .

Во многих случаях $\gamma^2 H_{xy}^2 T_1 T_2 \ll 1$. Это имеет место всякий раз, когда один или более из трех параметров, H_{xy} , T_1 или T_2 , достаточно мал. В частности, малой может быть величина H_{xy} . В этом случае, как это видно из уравнения (9.29 а), $M_z = \bar{M}_z$, т.е. распределение ядер по ориентациям вдоль оси z остается бoльцмановским. Из уравнения (9.36) следует, что

$$\Delta\omega_{1/2} = 2/T_2 \quad \text{при} \quad \gamma^2 H_{xy}^2 T_1 T_2 \ll 1 \quad (9.37)$$

Следовательно, в этом случае из ширины линии можно прямо найти T_2 . Заметим также, что при $\gamma^2 H_{xy}^2 T_1 T_2 \ll 1$ уравнение (9.33) сводится к

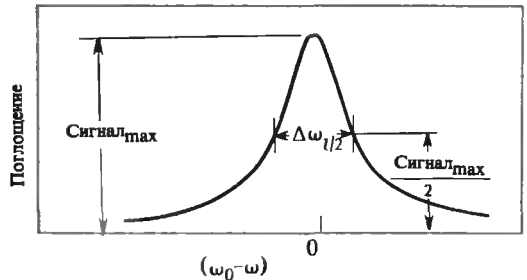


РИС. 9.10. Определение ширины линии $\Delta\omega_{1/2}$.

$$\text{Сигнал}_{\max} = \kappa T_2 \quad (9.38)$$

Таким образом, интенсивность сигнала здесь также определяется величиной T_2 .

Причину прямой зависимости интенсивности сигнала от T_2 [уравнение (9.38)] нетрудно понять. Напомним, что T_2 — это время релаксации поперечной составляющей намагниченности (M_{xy}) к равновесному нулевому значению. Ясно, что чем меньше T_2 , тем меньше стационарное значение M_{xy} [см. уравнение (9.29в) при $\gamma^2 H^2 T_1 T_2 \ll 1$]. Следовательно, вращающий момент $\mathbf{M}_{xy} \times \mathbf{H}_{xy}$, который приводит к изменению M_z , уменьшается и как результат этого уменьшается поглощение.

Нетрудно понять и причину уширения линий при малых T_2 [уравнение (9.36)]. При $\omega \neq \omega_0$ более быстрое разупорядочение поперечных составляющих намагниченности частично компенсируется из-за того, что $\mathbf{H}_{xy}$ не отвечает более частоте прецессии. При больших T_2 вращающий момент $\mathbf{H}_{xy} \times \mathbf{M}_z$ непрерывно порождает поперечные компоненты намагниченности, которые (при $\omega \neq \omega_0$) оказываются не в фазе друг с другом и в силу этого взаимно уничтожаются. При малых T_2 поперечные компоненты, вызываемые действием $\mathbf{H}_{xy}$, быстро исчезают, так что при $\omega \neq \omega_0$ они не успевают интерферировать, чтобы погасить друг друга. Это значит, что мгновенная намагниченность в плоскости $x - y$ может как-то взаимодействовать с $\mathbf{H}_{xy}$ даже при частотах, которые при больших T_2 отвечали бы маленькому сигналу. Результатом этого является уширение линии.

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА T_2

Время поперечной релаксации T_2 определяется несколькими факторами. Во-первых, данное ядро находится, вообще говоря, не в поле $\mathbf{H}_z$, а в поле $\mathbf{H}_z + \Delta \mathbf{H}_{\text{лок}}$, где $\Delta \mathbf{H}_{\text{лок}}$ — небольшое флуктуирующее возмущающее поле, порождаемое локальным окружением этого ядра. Если амплитуда флуктуации равна $\Delta H_{\text{лок}}^0$, то ядра в каждый момент времени будут обладать разбросом значений ларморовой частоты $\Delta \omega$, примерно равным $\gamma \Delta H_{\text{лок}}^0$. Таким образом, если в некоторый момент времени ядра находились в фазе, а затем произошло резкое выключение поля $\mathbf{H}_{xy}$, то по прошествии времени $\Delta t = \Delta \omega^{-1}$ фазы ядер будут обладать разбросом в 1 рад. Очевидно, что этот эффект приводит к исчезновению поперечной составляющей намагниченности M_{xy} и уменьшает наблюдаемое время поперечной релаксации.

Вторым фактором, влияющим на T_2 , является спиновый обмен. Соседние ядра с противоположно ориентированными спинами могут обмениваться ими. Благодаря этому процессу ядра изменяют свои спиновые состояния, но так, что их суммарный спин остается прежним. Хотя такой обменный процесс не затрагивает суммарного спина, он приводит к нарушению фазового соотношения между ядрами и, следовательно, вызывает уменьшение T_2 .

Наконец, следует помнить, что процессы продольной релаксации также влияют на T_2 просто потому, что всякое изменение спиновых уровней энергии ядер (связанное с установлением бальмановского распределения по ориентациям относительно оси z) приводит к потере фазовых соотношений.

Наблюдаемая скорость поперечной релаксации ($1/T_2$) равна просто сумме скоростей только что описанных процессов. Пусть $1/T_2'$ — скорость, отвечающая первым двум механизмам (влиянию $\Delta \mathbf{H}_{\text{лок}}$ и спинового обмену). Тогда

$$1/T_2 = (1/T_2') + (1/2)(1/T_1)$$

Наличие множителя $1/2$ перед $1/T_1$ связано с тем, что в действительности изменения спинового состояния происходят вдвое медленнее, чем продольная релаксация, характерная

скорость которой равна T_1^{-1} . Это обусловлено тем, что разность чисел заполнения спиновых состояний изменяется на два, когда одно ядро переходит из одного состояния в другое.

Рассмотрим теперь влияние вязкости (или τ_c) на T_2 (рис. 9.9). При малых η время τ_c столь мало, что изменения $\Delta H_{\text{лок}} \approx 0$, а соседние ядра проводят слишком мало времени в непосредственной близости от исследуемого ядра, чтобы мог произойти спиновый обмен. Следовательно, $1/T_2' \rightarrow 0$ и $1/T_2 \approx (1/2) T_1^{-1}$. Согласно уравнению (9.37), в этом случае ширина линии $\Delta\omega_{1/2} = T_1^{-1}$; такая ширина называется *естественной*. По мере увеличения η влияние $\Delta H_{\text{лок}}$ и спинового обмена становится все более заметным, $1/T_2'$ возрастает до некой конечной величины, T_2 уменьшается, и происходит уширение линий [уравнение (9.37)]. При дальнейшем возрастании η молекулярное движение становится настолько интенсивным, что влияние $\Delta H_{\text{лок}}$ и спинового обмена достигает максимума. При этом T_2 выходит на плато, и при дальнейшем возрастании η остается неизменным.

Из всего сказанного становится ясно, почему ширина линий для твердых тел, где молекулярное движение в значительной мере заторможено, оказывается довольно большой. В случае макромолекул в растворах также могут наблюдаться широкие линии — из-за больших времен переориентации, что в свою очередь препятствует усреднению $\Delta H_{\text{лок}}$.

Следует отметить, что на наблюдаемую ширину линий могут влиять и характеристики прибора. Создать совершенно однородное поле вдоль оси z невозможно. В результате наличия некоторого поля, направленного поперек образца, ядра будут прецессировать с немного различающимися частотами, что приведет к кажущемуся уширению линий, известному под названием неоднородного уширения. Этот эффект может быть в значительной мере устранен путем вращения образца с частотой, превышающей T_2^{-1} ; при этом на все ядра будет действовать некоторое постоянное усредненное поле. Такая процедура может вызвать также появление «боковых от вращения», расположенных в спектре ЯМР на расстояниях, кратных частоте вращения образца.

● ИЗМЕРЕНИЕ T_1 И T_2 ИМПУЛЬСНЫМИ МЕТОДАМИ

Для измерения времени поперечной и продольной релаксации обычно применяют специальные импульсные методы. В этих методах используют импульсы или определенные последовательности импульсов интенсивного магнитного поля H_1 ларморовой частоты, которое перпендикулярно основному полю H_z , и таким образом отклоняют вектор результирующей намагниченности M от направления вдоль оси z . Обычно применяют на-

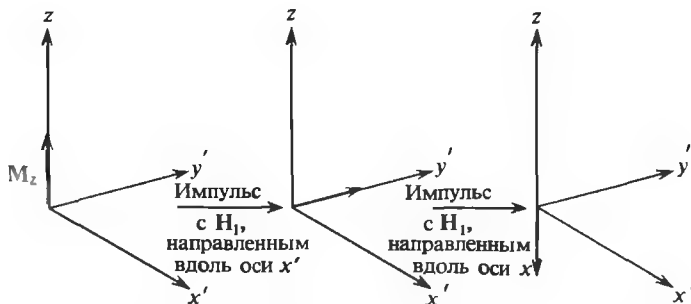


РИС. 9.11. Схема импульсного ЯМР-эксперимента, демонстрирующая результат наложения двух последовательных импульсов с вектором H_1 , направленным вдоль оси x' .

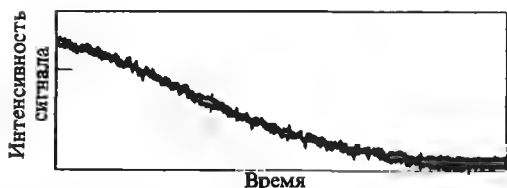


РИС. 9.12. Спиновое эхо. Затухание сигнала от ^{23}Na в насыщенном растворе NaCl . (James T.L., Nuclear Magnetic Resonance in Biochemistry, New York, Academic Press. 1975.)

пульсы двух типов, называемые 90° -ным $\mathbf{H}_1$ -импульсом и 180° -ным $\mathbf{H}_1$ -импульсом (рис. 9.11). Первый поворачивает $\mathbf{M}_z$ на 90° , а второй — на 180° . Точное значение угла нутации θ определяется соотношением $\theta = \gamma H_1 \Delta t$, где γ — гиромагнитное отношение для исследуемого ядра, Δt — длительность импульса. Ясно, что при соответствующем выборе H_1 и Δt можно получить значение $\theta = 180^\circ$.

Во вращающейся системе координат (x' y' z , где x' и y' вращаются вокруг фиксированной оси z) поле $\mathbf{H}_1$ приложено вдоль оси x' , а регистрируется y' -составляющая $\mathbf{M}$. Время Δt обычно составляет от 1 до 200 мкс и в большинстве случаев оказывается достаточно малым, чтобы смогли произойти продольная или поперечная релаксация. После приложения короткого импульса система находится в неравновесном состоянии. Ее возврат к равновесию сопровождается появлением быстро исчезающего сигнала (так называемого эха), наблюдаемого вдоль оси y' . Этот сигнал спадает по закону e^{-t/T_2} , где T_2 зависит, в частности, от степени неоднородности магнитного поля (если такая неоднородность есть). На рис. 9.12 представлено эхо сигнала ЯМР ^{23}Na в растворе NaCl .

Время спин-решеточной (T_1) и спин-спиновой (T_2) релаксации обычно измеряют при помощи специальной последовательности импульсов. В качестве примера рассмотрим измерение времени спин-решеточной релаксации T_1 путем воздействия на систему последовательностью двух чередующихся импульсов, 180° -ного и 90° -ного с интервалом между ними τ . 180° -ный импульс меняет начальное значение M_z на $-M_z$; после выключения импульса намагниченность в направлении оси z релаксирует к равновесному значению по закону e^{-t/T_1} . По истечении времени τ разность между M_z и его равновесным значением $\bar{M}_z$ уменьшается в $e^{-\tau/T_1}$ раз; если в этот момент подать 90° -ный импульс, то по величине составляющей M_y можно будет судить, как далеко зашел процесс продольной релаксации. Если, например, $\tau \gg T_1$, то $M_z \approx M_z$ и 90° -ный импульс вызовет максимальную намагниченность M_y . Однако при $\tau \leq T_1$ $M_z < M_z$, и составляющая M_y , порожденная 90° -ным импульсом, будет меньше. Следовательно, мерой величины T_1 может служить амплитуда сигнала, вызванного 90° -ным импульсом, измеряемая как функция промежутка времени между 180° -ным 90° -ным импульсами. Оказалось, что при измерении T_2 методом спинового эха лучше всего использовать последовательность импульсов « 90° - τ - 180° ».

● СПЕКТР ПОГЛОЩЕНИЯ КАК ФУРЬЕ-ПРЕОБРАЗОВАНИЕ СПИНОВОГО ЭХА

Итак, спиновое эхо наблюдается после выключения импульса переменного поля $\mathbf{H}_1$ резонансной частоты. Пусть амплитуда эха составляет $g(t)$. Можно показать, что функция, описывающая форму спектра поглощения, $g(\omega)$, имеет вид

$$g(\omega) = \text{const} \int_0^\infty g(t) \cos \omega t \, dt \quad (9.39)$$

где постоянная необходима для нормировки. [Выражение для $g(\omega)$ в явном виде дается уравнением (9.30).] Синус-преобразование $g(t)$ дает зависимость от частоты, а преобразование Фурье $g(\omega)$ приводит к временной зависимости $g(t)$. Следовательно, регистрация спинного эха при помощи импульсных методов и измерение спектров поглощения и дисперсии ЯМР являются в действительности взаимозаменяемыми, хотя каждый из этих методов обладает своими преимуществами.

С практической точки зрения наиболее важно получить спектр поглощения с достаточно хорошим разрешением. Для этого при измерениях ЯМР с непрерывно изменяющейся частотой усредняют спектры, полученные за длительный промежуток времени, с помощью накопителя сигналов, называемого компьютером среднего сигнала. Идея метода состоит в постепенном избавлении от шумовых сигналов, которые взаимно уничтожаются по мере увеличения количества усредняемых спектров. После N сканирований шум уменьшается в $N^{1/2}$ раз, т.е. 100 сканирований могут увеличить отношение сигнал/шум в 10 раз по сравнению с однократным сканированием. Однако время, необходимое для проведения одного сканирования, зависит также от разрешения, которое хотят получить. Например, при разрешении в 1 Гц для снятия одного спектра шириной 10^3 Гц нужно $\sim 10^3$ с. Таким образом, чтобы провести несколько сканирований для накопления спектров, требуется довольно много времени.

Метод преобразования Фурье менее трудоемкий в первую очередь потому, что при этом весь спектр снимается фактически сразу, т.е., применяя преобразование Фурье к экспериментальной кривой спинного эха, получают весь спектр. Так, для получения спектра шириной 10^3 Гц с разрешением ~ 1 Гц требуется около 1 с. Как отмечалось выше, для того чтобы один раз снять такой же спектр при непрерывном изменении частоты, необходимо 10^3 с.

Метод преобразования Фурье имеет и другие преимущества, которые мы здесь не обсуждаем. Недостатком же его является то, что слабые сигналы от протонов гораздо труднее зарегистрировать в присутствии протонов воды, даже если использовать D_2O , поскольку сигналы от остаточных количеств HDO тоже создают значительные помехи. В этой ситуации могут помочь методики устранения из спектров сигналов от H_2O и HDO. Какой из подходов окажется предпочтительнее — в конечном счете определяется конкретными экспериментальными условиями.

9.5. Особенности спектров ЯМР

ХИМИЧЕСКИЙ СДВИГ

Может показаться, что резонансная частота протона γH_z определяется лишь его гиромагнитным отношением γ и величиной приложенного поля H_z . Если бы это было так, метод ЯМР не представлял бы большой ценности, так как протонам в разных соединениях (или различным протонам одного соединения) соответствовал бы ЯМР-сигнал одной и той же частоты и, следовательно, эти протоны были бы неразличимы. Однако на самом деле на протон действует поле не H_z , а H'_z , равное

$$H'_z = H_z - H_z\sigma = H_z(1 - \sigma)$$

$$\sigma = \frac{H_z - H'_z}{H_z} \quad (9.40)$$

σ — это постоянная, которая показывает, в какой мере истинное поле, в котором находится данное ядро, отличается от приложенного внешнего поля H_z . Истинное поле H'_z

прямо пропорционально внешнему полю H_z . Возмущение, вносимое локальным окружением ядра, принято характеризовать величиной химического сдвига δ , равного

$$\begin{aligned}\delta &= [(H_{\text{этал}} - H_{\text{обр}})/H_{\text{этал}}] \cdot 10^6 = \\ &= [(\nu_{\text{этал}} - \nu_{\text{обр}})/\nu_{\text{этал}}] \cdot 10^6\end{aligned}\quad (9.41)$$

где $H_{\text{этал}}$ — поле, при котором наблюдается резонансное поглощение ядра в составе эталонного вещества, а $H_{\text{обр}}$ — резонансное значение для этого же ядра в составе изучаемого вещества. Аналогично $\nu_{\text{этал}}$ и $\nu_{\text{обр}}$ — это резонансные частоты ($\nu = \omega/2\pi$) для данного ядра в эталонном веществе и в образце соответственно. Наличие множителя 10^6 связано с тем, что химический сдвиг принято выражать в миллионных долях (м.д.), δ , являясь нормированным безразмерным параметром, не зависит от рабочей частоты прибора. Выражение (9.41) для δ аналогично выражению (9.40) для σ .

При полях в 50 000 Гс линии резонансного поглощения большинства протонов лежат в интервале 2500 Гц вблизи частоты 220 МГц. Это значит, что типичные значения δ составляют от 0 до 10 м.д.

В случае водных растворов в качестве эталона для протонов обычно используют 2,2-диметил-2-силанпентан-5-сульфонат натрия (ДСС), а в случае неводных растворов — тетраметилсилан (ТМС). Резонансные частоты для протонов метильных групп этих соединений практически совпадают. Для большинства других протонов резонанс наблюдается при более низких частотах.

На рис. 9.13 представлен спектр ЯМР аденина в области 220 МГц в 1 М NaOD (растворитель D_2O) с указанием положения резонансных линий для Н-8 и Н-2. Эти линии смещены в область более слабых полей — для Н-8 на 7,79 м.д., а для Н-2 на 7,70 м.д. На рисунке указано также значение часто используемого параметра τ . Этот параметр определяется как $\tau = 10 - \delta$; таким образом, τ для данного эталона равно 10.

Величина химического сдвига определяется параметром σ , задаваемым выражением (9.40). Этот параметр в свою очередь складывается из трех составляющих: $\sigma = \sigma_1 + \sigma_2 + \sigma_3$. σ_1 определяется локальными диамагнитными эффектами. Когда на атом начинает действовать внешнее магнитное поле, в нем возникают круговые электронные токи, циркулирующие в плоскости, перпендикулярной полю. Направление этих токов таково, что генерируемое ими слабое магнитное поле направлено противоположно H_z . В результате сум-

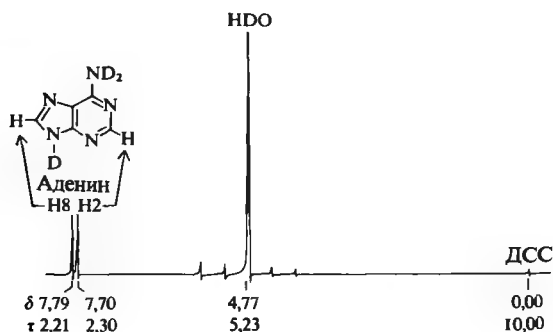


РИС. 9.13. Спектр ЯМР аденина в D_2O , полученный при рабочей частоте 220 МГц. Приведены линии резонансного поглощения для Н-8 и Н-2. Протоны боковых групп замещены дейтерием. Небольшие пики, расположенные вблизи линии поглощения НДО, — «боковые от вращения». Значения δ и τ указаны относительно соответствующих параметров для эталона ДСС. (James T.L., Nuclear Magnetic Resonance in Biochemistry, New York, Academic Press, 1975.)

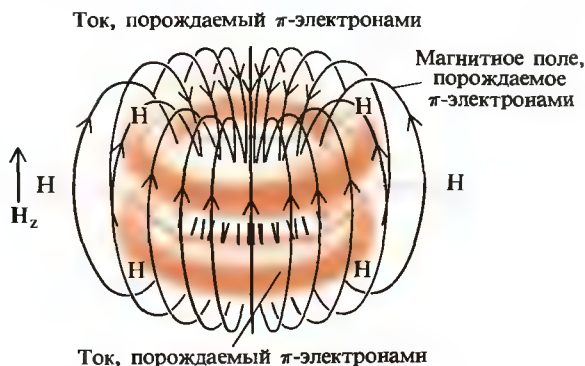


РИС. 9.14. Влияние кольцевых токов на локальное магнитное поле, действующее на протоны ароматического кольца. H_z — внешнее магнитное поле.

марное поле уменьшается (следовательно, σ_1 положительно).

Параметр σ_2 определяется главным образом парамагнитными эффектами от соседних атомов и в меньшей степени — диамагнитными эффектами, а σ_3 зависит от межатомных токов. Каждый из этих двух параметров может, вообще говоря, принимать и положительные, и отрицательные значения.

Если σ положительно, то для достижения резонанса при заданной частоте необходимо приложить большее внешнее поле H_z . Так, если при $\sigma = 0$ резонансное значение поля составляет $H_z^{\text{рез}}$, то теперь для достижения резонанса оно должно возрасти на величину $\sigma H_z^{\text{рез}}$.

Интересное явление наблюдается в случае ароматических соединений. Оно иллюстрируется рис. 9.14 на примере бензола. Известно, что для протонов ароматического цикла резонанс наблюдается при аномально малых полях. Это связано с наличием кольцевых токов, генерируемых шестью π -электронами. Большой по величине электронный ток, индуцированный внешним полем, порождает магнитное поле, которое непосредственно над и под кольцом направлено противоположно внешнему полю. Однако вокруг кольца магнитное поле кольцевых токов имеет то же направление, что и внешнее поле. Таким образом, протоны боковых групп находятся в более сильном поле, чем H_z . Этот эффект приводит к тому, что резонанс наблюдается при меньших внешних полях, причем эффект может быть довольно значительным; например, линия, отвечающая протонам бензола, сдвигается на 1,48 м.д. в сторону слабых полей по сравнению с протонами 1,3-циклогексадиена.

Другим важным для биологических систем эффектом является химический сдвиг, обусловленный образованием водородных связей. В системе типа $D-H \cdots A$ для протона обычно наблюдается слабopольный сдвиг. По-видимому, это связано с действием акцептора A на диамагнитные токи в группе $D-H$, приводящим к некоторому уменьшению экранировки. Результирующий сдвиг может превышать 1 м.д.

ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

Из уравнения (9.41) явствует, что наблюдаемые на опыте сдвиги $H_{\text{обр}} - H_{\text{этал}}$ и $\nu_{\text{обр}} - \nu_{\text{этал}}$ равны $\delta H_{\text{этал}}$ и $\delta \nu_{\text{этал}}$ соответственно. Чем сильнее внешнее поле H_z , тем больше должна быть резонансная частота, поскольку она определяется соотношением $\omega = 2\pi\nu = \gamma H$; и напротив, если прибор работает при постоянной высокой частоте, то для достижения резонанса требуются большие поля. Таким образом, чем выше частота,

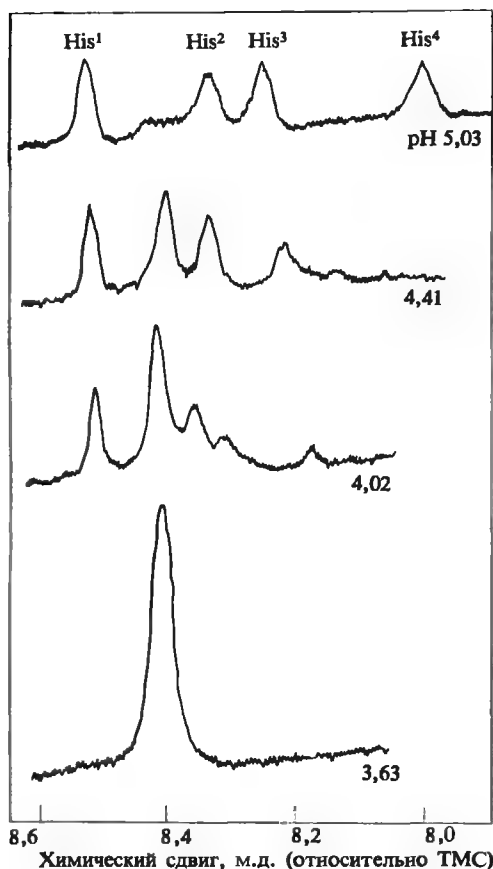


РИС. 9.15. Спектр ЯМР С-2-протонов имидазольных колец гистидиновых остатков стафилококковой нуклеазы. Соответствующие сигналы помечены His¹, His² и т.д. [Epstein H.F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68, 2042 (1971).]

тем больше должно быть внешнее поле, и наоборот. Поскольку наблюдаемый химический сдвиг пропорционален приложенному внешнему полю и частоте, при больших значениях этих параметров линии спектра ЯМР будут дальше отстоять друг от друга. Вот почему при конструировании новых приборов стремятся достичь все более высоких рабочих частот; имеются приборы, работающие на частотах 360 МГц и даже выше, в которых линии ЯМР от двух протонов отстоят друг от друга в шесть раз дальше, чем в некогда распространенных приборах с рабочей частотой 60 МГц, где две эти линии с трудом могли быть разрешены.

Возможности ЯМР высокого разрешения хорошо иллюстрирует рис. 9.15, где представлены спектры, полученные при рабочей частоте 220 МГц, для С-2-протонов четырех различных гистидиновых остатков стафилококковой нуклеазы. Белок подвергали обратной денатурации путем изменения рН. При рН 5 белок находится в нативной конформации, и линии для всех четырех С-2-протонов хорошо разрешены. Все линии располагаются в интервале всего лишь 0,5 м.д., но этого оказывается вполне достаточно для хорошего их разрешения при данной рабочей частоте. Наличие четырех разных линий означает, что в нативной конформации магнитное окружение протонов различается (разные значения σ). Важно также заметить, что площади всех пиков приблизительно одинаковы, следова-

тельно, одинаковы и концентрации С-2-протонов¹⁾. При понижении рН белок денатурирует, и при рН 3,6 происходит слияние всех четырех сигналов в один, расположенный при 8,44 м.д., интенсивность которого равна сумме интенсивностей четырех исходных сигналов. Следовательно, в денатурированной форме все четыре протона имеют одинаковое магнитное окружение.

Довольно интересным представляется то обстоятельство, что при изменении рН до значений, отвечающих частичной денатурации, магнитное окружение С-2-протонов меняется по-разному: интенсивность соответствующих ЯМР-сигналов уменьшается в разной степени. Это означает, что участки белковой молекулы, в которых локализованы четыре гистидиновых остатка, в ходе денатурации изменяются в какой-то степени независимо. С другой стороны, если отложить интенсивности отдельных пиков как функцию рН, то получатся крутые кривые, что свидетельствует о кооперативности процесса денатурации.

Приведенные спектры иллюстрируют высокоспецифичную информативность спектров ЯМР, полученных при частоте 220 МГц. Если те же спектры снимать на приборе с рабочей частотой 60 МГц, разрешение снизится примерно в четыре раза и различить сигналы от разных гистидинов станет невозможно.

СПИН-СПИНОВОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ ЛИНИЙ

Спин-спиновое расщепление связано с тем влиянием, которое оказывают на магнитное поле, действующее на исследуемое ядро, соседние ядра. На рис. 9.16, А показан результат такого расщепления в спектрах этоксиуксусной кислоты, полученных при рабочей частоте 60 МГц. Заметим, что метильная группа представлена тремя линиями (триплет), а соседней метиленовой группе отвечают четыре линии (квартет). Расстояние J между соседними компонентами, называемое константой расщепления, одинаково в обоих мультиплетах.

Спин-спиновое расщепление линий обусловлено взаимодействием между спинами соседних ядер, которое осуществляется с помощью связывающих электронов; оно зависит от расстояния между ядрами, типа химической связи, от величины валентного угла и спина ядер. В том случае, когда величина J много меньше сдвига частот $\Delta\nu$ между различными группами (обычно необходимо, чтобы выполнялось условие $J \ll 0,1\Delta\nu$), можно предсказать число линий в мультиплете и их относительную интенсивность. Расчет мультиплетности основывается на анализе возможных взаимных ориентаций спинов протонов, относящихся к данной группе. В качестве примера на рис. 9.16, Б приведены ориентации спинов протонов метиленовой группы, соседствующей с метильной группой. Два спина могут создавать три разные комбинации, вероятности которых относятся как 1:2:1. Им соответствуют три разных типа окружения соседней метильной группы, в результате чего ее ЯМР-сигнал расщепляется на три линии, интенсивности которых относятся как 1:2:1. Аналогично протонам метильной группы соответствуют четыре комбинации спинов; вероятности комбинаций относятся как 1:3:3:1. Этим объясняется расщепление ЯМР-сигнала соседней метиленовой группы на четыре линии с отношением интенсивностей 1:3:3:1. Для метиленовой группы, соседствующей с COO^- -группой, расщепления не наблюдается, поскольку она отделена от другой метиленовой группы кислородом эфирной группы.

Когда $J > 0,1\Delta\nu$, спектр ЯМР может оказаться гораздо сложнее, чем изображенный на рис. 9.16, А, где расщепление обусловлено главным образом взаимодействием «перво-

¹⁾ Связь между площадью пика ЯМР и концентрацией вытекает из уравнения (9.30) и последующего изложения.

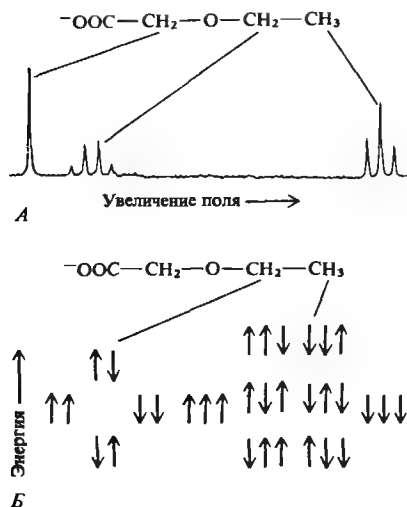


РИС. 9.16. Спектр ЯМР этоксиуксусной кислоты в водном растворе. А. Спектр, полученный при частоте 60 МГц. Б. Ориентации спинов для протонов метильной и метиленовой групп этоксиуксусной кислоты. (James T.L., Nuclear Magnetic Resonance in Biochemistry, New York, Academic Press, 1975.)

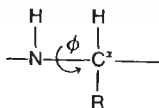
го порядка». Для упрощения интерпретации таких сложных спектров разработаны специальные методы. Например, спин-спиновое расщепление не зависит от величины внешнего поля, а поскольку химический сдвиг зависит от этого параметра, можно достичь такого увеличения $\Delta\nu$, при котором проявляются лишь эффекты первого порядка ($J \leq 0,1\Delta\nu$). Другой подход основан на использовании двойного резонанса. В этом случае прикладывают еще одно поле, осциллирующее с резонансной частотой, характерной для ядер, вызывающих расщепление сигнала изучаемых ядер. Если это приводит к насыщению возмущающих ядер, то исследуемый мультиплет превращается в синглет. Эта процедура известна под названием «спиновой развязки».

Константа расщепления J зависит от структуры молекулы. Карплюс (Karplus M., 1959, 1963) показал, что для молекул, аналогичных этану, значение J для протонов, связанных с соседними атомами углерода, зависит от двугранного угла ϕ между рассматриваемыми $\text{C}-\text{H}$ связями (рис. 9.17; см. также гл. 5). Эта зависимость выглядит следующим образом:

$$J = A + B \cos \phi + C \cos 2\phi \quad (9.42)$$

где A , B и C — постоянные. Из уравнения (9.42) следует, что J велико при $\phi = 0$ или 180° и очень мало при $\phi = 90^\circ$ (аксиально-экваториальное строение).

Многие исследователи использовали соотношение между J и величиной двугранного угла для выяснения конформаций различных молекул. Хотя подобный анализ сталкивается с определенными трудностями (из-за отсутствия полной ясности относительно того, как те или иные молекулярные параметры влияют на величину J для различных химических соединений), с его помощью все же удалось получить некоторую полезную информацию. Например, в пептидах можно измерить взаимодействие между протоном, присоединенным к атому азота, и соседним протоном, связанным с атомом углерода C^α :



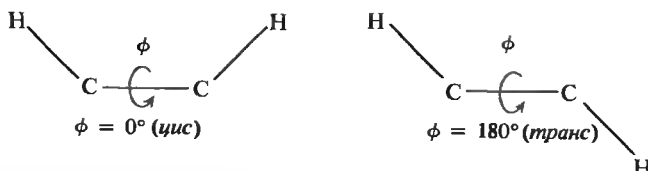
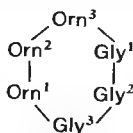


РИС. 9.17. Двугранный угол ϕ , определяющий взаимное положение двух С—Н-связей в молекуле типа этана (подробнее о двугранных углах см. гл. 5).

Эти измерения позволяют оценить промежуточные значения двугранного угла ϕ . Особенно интересная работа была проделана Г.Рамачандраном и др., которые исследовали довольно жесткий циклический пептид алюминохром:



Значения ϕ для остатков орнитина были оценены на основании измерений констант расщепления и сравнены с величинами, полученными при рентгеноструктурном анализе феррихрома А, железосвязывающего аналога алюминохрома, у которого остатки Gly¹ и Gly² заменены остатками серина. В табл. 9.2 представлены результаты этого анализа. Значения ϕ , определенные этими двумя методами, близки между собой, что служит веским аргументом в пользу применения ЯМР для структурных исследований.

Много работ было посвящено также изучению линейных пептидов в растворе. Поскольку здесь имеется не одна фиксированная конформация, а некоторое распределение по конформациям, речь может идти лишь о среднем ϕ . Благодаря изучению взаимодействия между ядрами атомов водорода и азота в системе вида

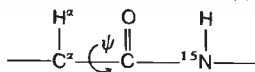


Таблица 9.2

ЗНАЧЕНИЯ ДВУГРАННЫХ УГЛОВ ϕ ДЛЯ ОСТАТКОВ ОРНИТИНА, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ ДАННЫХ ПО ИЗМЕРЕНИЮ КОНСТАНТЫ РАСЩЕПЛЕНИЯ J И С ПОМОЩЬЮ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА^{1), 2)}

Остаток	Средняя для двух растворителей величина J , Гц	ϕ (по результатам измерения J)	ϕ (по данным рентгеноструктурного анализа)
Orn ¹	7,6	— 150°	— 145°
Orn ²	5,4	— 73°	— 77°
Orn ³	8,6	— 100°	— 104°

1) Ramachandran G. N., Chandrasekaran R., Kopple K. D., Biopolymers, 10, 2113 (1971).

2) J представляет собой константу расщепления для протонов группы Н—N—C^α—Н в остатках орнитина алюминохрома. Значения ϕ с пометкой «по данным рентгеноструктурного анализа» были определены для остатков орнитина феррихрома.

была получена приблизительная величина двугранного угла ψ для связи между атомом углерода C^α и углеродом карбонильной группы. Здесь регистрировалось взаимодействие между атомами H^α и ^{15}N . При помощи измерений констант взаимодействий между близлежащими ядрами были также исследованы конформации сахаров. Мы не будем здесь останавливаться на этих данных; отметим только, что метод Карплюса (показавшего, что константа J зависит от двугранного угла) нашел широкое применение.

ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ КОМПЛЕКСОВ С ПОМОЩЬЮ ПАРАМАГНИТНЫХ ЗОНДОВ

Магнитный момент неспаренного электрона примерно в 10^3 раз превышает магнитный момент ядра (разд. 9.7). Следовательно, парамагнитные соединения могут оказывать существенное влияние на магнитное окружение ядер, вызывая сдвиг ЯМР-линий и изменяя времена релаксаций. Парамагнитный сдвиг может быть весьма значительным, как это видно на примере спектра протонного резонанса парамагнитного соединения Fe^{3+} -цианометмиоглобина из кашалота, где наблюдаемые линии спектра ЯМР располагаются в интервалах от -27 до $+3$ м.д. Тот факт, что парамагнитные соединения влияют на химический сдвиг, повлек за собой создание специальных реагентов, таких, как лантаниды, которые можно использовать для упрощения спектров ЯМР.

Из-за наличия у неспаренного электрона большого магнитного момента парамагнитные соединения способны вызывать эффективную релаксацию. Влияние таких парамагнитных агентов на T_1 и T_2 позволяет использовать их для получения полезной структурной информации. Особенно часто для этих целей применяется ион Mn^{2+} , поскольку он способен замещать диамагнитный ион Mg^{2+} во многих системах, не приводя к потере ими биологической активности.

Одним из экспериментов такого рода является измерение T_1 протонов воды — один раз в присутствии свободного Mn^{2+} , а другой — в присутствии Mn^{2+} , связанного с какой-либо макромолекулой (например, с ферментом). На основании этих измерений можно определить число молекул воды, связанных с ионом Mn^{2+} . Предполагая для Mn^{2+} октаэдрическую систему координационных связей (что, по-видимому, имеет место в действительности) и вычитая полученное из эксперимента число связанных с Mn^{2+} молекул воды, определяют, сколько молекул лигандов предоставляет макромолекула. Данные о количестве связанной воды позволяют также судить о доступности иона металла в составе макромолекулы для воды. Например, к Mn^{2+} в комплексе с карбоксипептидазой А и с пируваткиназой присоединены одна и три молекулы воды соответственно. Это означает, что Mn^{2+} в значительной степени экранирован от водной среды, по крайней мере в случае карбоксипептидазы А.

В экспериментах другого типа используется влияние парамагнитных веществ на времена T_1 и T_2 , которые зависят от расстояния r между протоном и парамагнитным центром как r^{-6} (James, 1975). Измеряя время релаксации протона, расположение которого в комплексе иона Mn^{2+} известно, можно оценить расстояния между ионом металла и другими протонами. На рис. 9.18 приведены данные, полученные с помощью такого подхода. Изучался комплекс пируваткиназа— Mn^{2+} — α -(дигидроксифосфинилметил)акрилат. На основании измерения расстояния между различными атомами в комплексе была построена его пространственная модель. (Расстояния, полученные при помощи ЯМР, заключены на рисунке в скобки.)

Исследования Т. Джеймса и М. Кон (James T.L., Cohn M., 1975) (чьи данные представлены на рис. 9.18) являются превосходным примером эффективности применения пара-

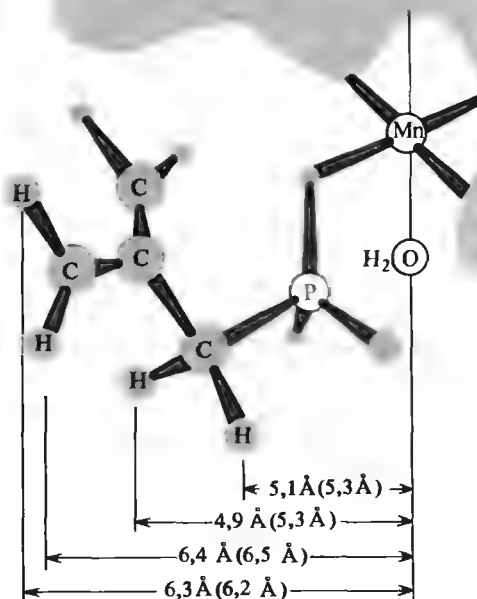


РИС. 9.18. Пространственная модель комплекса пируваткиназа—Mn(II)— α -(дигидроксифосфинилметил)акрилат. Приведены расстояния, полученные из молекулярной модели; в скобках указаны экспериментальные величины. [James T.L., Cohn M., J. Biol. Chem., **249**, 3519 (1975).]

магнитных зондов. Были использованы и некоторые другие системы. Особый интерес представляют случаи, когда расстояния, определенные при помощи ЯМР, можно сравнить с данными рентгеноструктурного анализа кристаллических образцов. Для ряда систем эти данные хорошо согласуются между собой.

ПРИМЕНЕНИЕ ЯМР ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ ДИНАМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Предположим теперь, что ядра обладают подвижностью и способны перемещаться из одного центра в другой. Примером может служить протон, локализованный в таком участке лиганда, который участвует в специфическом связывании последнего с макромолекулой. В этом случае химические сдвиги для свободного и связанного лигандов могут быть существенно разными. В пределе, когда переход ядра из одного центра в другой отсутствует, будут наблюдаться две четко различимые линии резонансного поглощения, отвечающие разному молекулярному окружению. В случае очень быстрого обмена останется только одна линия, расположенная между двумя указанными выше.

На рис. 9.19 схематически изображено изменение спектра ЯМР при переходе ядра из одного центра в другой. Обозначим через А и В два центра с разным химическим окружением данного ядра. Пусть время жизни ядра в окружении А равно τ_A , а в окружении В — τ_B . (Вероятность того, что данное ядро, находившееся в момент времени $t = 0$ в состоянии А, через время t останется в этом состоянии, есть e^{-t/τ_A} .) Резонансные частоты для этих состояний равны соответственно ω_A и ω_B . Когда $\tau_A \gg (\omega_A - \omega_B)^{-1}$ и $\tau_B \gg (\omega_A - \omega_B)^{-1}$, наблюдаются две четко различимые линии (рис. 9.19). При выполнении этих условий «медленного обмена» время поперечной релаксации T_{2A} , отвечающее резонансу при частоте ω_A , равно

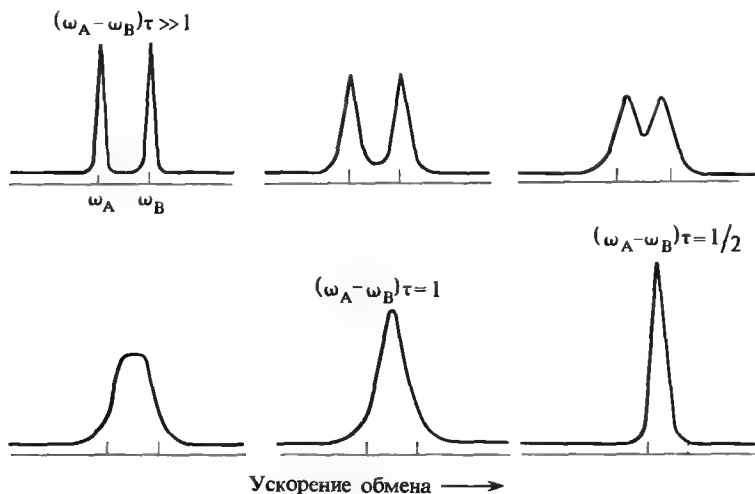


РИС. 9.19. Влияние обмена на спектр ЯМР. Ядра, которыми обмениваются два центра, А и В, обладают характерными резонансными частотами ω_A и ω_B . Предполагается, что заселенность обоих центров одинакова ($\chi_A = \chi_B = 1/2$) и $\tau_A = \tau_B = \tau$. (James T.L., Nuclear Magnetic Resonance in Biochemistry, New York, Academic Press, 1975.)

$$T_{2A}^{-1} = (T_{2A}^0)^{-1} + \tau_A^{-1} \quad (9.43)$$

где T_{2A}^0 — время релаксации в отсутствие обмена. В подобной ситуации влияние τ_A сводится просто к уменьшению величины T_{2A} и к уширению линии при частоте ω_A . Следовательно, при медленном обмене параметр τ_A (и аналогично τ_B) можно получить, измерив уширение, вызванное обменом.

Когда скорость обмена такова, что $\tau_A < (\omega_A - \omega_B)^{-1}$ и $\tau_B < (\omega_A - \omega_B)^{-1}$, наблюдается только одна линия (рис. 9.19). В этих условиях время поперечной релаксации T_2 , отвечающее этой единственной линии, определяется как

$$T_2^{-1} = \hat{\chi}_A(T_{2A}^0)^{-1} + \hat{\chi}_B(T_{2B}^0)^{-1} + \hat{\chi}_A^2 \hat{\chi}_B^2 (\omega_A - \omega_B)^2 (\tau_A + \tau_B) \quad (9.44)$$

где $\hat{\chi}_A$ и $\hat{\chi}_B$ — относительное количество ядер, пребывающих в состояниях А и В соответственно. В этой ситуации ширина единственной линии зависит от заселенностей каждого из состояний и от времен жизни τ_A и τ_B . Этот эффект называется *обменным уширением*. Оценить параметры τ_A и τ_B часто не составляет большого труда. Например, если обмен протоном между молекулами воды и этанола исследуется в водно-спиртовой смеси, относительная заселенность каждого из состояний определяется просто как мольная доля воды или спирта. Если рассматривается переход лиганда между свободным и связанным состояниями, заселенности соответствующих состояний можно найти, зная константу равновесия реакции присоединения лиганда.

Интересно отметить, что при τ_A и $\tau_B \rightarrow 0$ уравнение (9.44) приобретает вид

$$T_2^{-1} = \hat{\chi}_A(T_{2A}^0)^{-1} + \hat{\chi}_B(T_{2B}^0)^{-1} \quad (9.45)$$

В этих условиях ширина единственной линии не зависит от времен жизни τ_A и τ_B .

Условия, при которых происходит слияние двух линий, могут быть при определенных

обстоятельствах использованы для определения τ_A и τ_B . Когда $\hat{\chi}_A = \hat{\chi}_B = 1/2$, $\tau_A = \tau_B$ и слияние двух линий отвечает условию

$$\tau = 2^{1/2}(\omega_A - \omega_B)^{-1}$$

где $2\tau = \tau_A = \tau_B$ и где предполагается также, что $(T_{2A}^0)^{-1} = (T_{2B}^0)^{-1} = 0$. Часто это соотношение оказывается весьма полезным.

9.6. Спектры ЯМР биологических систем

СПЕКТРЫ ПРОТОННОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА БЕЛКОВ

Молекулы небольших белков содержат $\sim 10^3$ протонов. В спектрах ЯМР протонов боковых групп свободных аминокислот соответствующие линии обычно отстоят друг от друга не более чем на 8 м.д. Например, линии ЯМР метильной и метиленовой групп свободных аминокислот обычно смещены относительно стандартного сигнала ДСС на величину от 0,8 до 3,5 м.д., в то время как для протонов, связанных с атомами углерода в ароматических, индольных и имидазольных кольцах, характерен сдвиг от 6,5 до 8,0 м.д. Такое плотное расположение линий затрудняет их идентификацию. Как будет видно из дальнейшего, одной из основных задач многих исследований является упрощение спектров и идентификация сигналов, отвечающих определенным остаткам, на фоне множества других сигналов.

Чтобы исключить многочисленные линии, отвечающие H_2O , спектры ЯМР белков обычно снимают в D_2O . При этом протоны, способные к обмену, замещаются дейтерием и, следовательно, не дают резонансных сигналов. Чтобы все протоны NH-групп заместились ядрами дейтерия, образец предварительно прогревают в D_2O .

В первом приближении спектр белка можно получить суммированием спектров отдельных боковых групп свободных аминокислот с учетом аминокислотного состава белка. Такой спектр довольно близок к спектру денатурированной белковой молекулы. Это сходство иллюстрирует рис. 9.20, где приведены спектры лизоцима, полученные при рабочей частоте 220 МГц, и расчетный спектр; последний обладает почти всеми характерными особенностями, свойственными спектру денатурированного белка при 80°C. В обоих случаях наблюдаемые линии лежат в пределах от -150 до -1800 Гц относительно стандартного сигнала ДСС. Линии, отвечающие группам $-CH_2$ и $-CH_3$, лежат в интервале от -150 до -750 Гц ($\sim$ от 0,7 до 3,4 м.д.), а для протонов, связанных с атомами углерода ароматических, индольных и имидазольных колец, резонанс наблюдается при частотах от -1500 до -1800 Гц ($\sim$ от 6,8 до 8,2 м.д.).

В отличие от беспорядочного клубка, спектр которого может быть получен простым суммированием спектров составляющих аминокислот, для нативного белка обычно характерен гораздо более сложный спектр (рис. 9.20, В). Заметим, что в спектре нативного лизоцима имеются линии, расположенные при частотах около -100 Гц, которые отсутствуют в спектре денатурированной формы. Различия в положении и интенсивности линий имеются и в области низких полей.

Ясно, что такие весьма существенные изменения в спектре связаны с изменением магнитного окружения многих ядер в нативной структуре. Спектр нативной формы, вообще говоря, очень информативен, но извлечь эту информацию бывает трудно. В отдельных случаях удается идентифицировать сигналы, отвечающие определенным остаткам, и проследить, как изменяются их параметры при различных условиях. Это можно сделать, на-

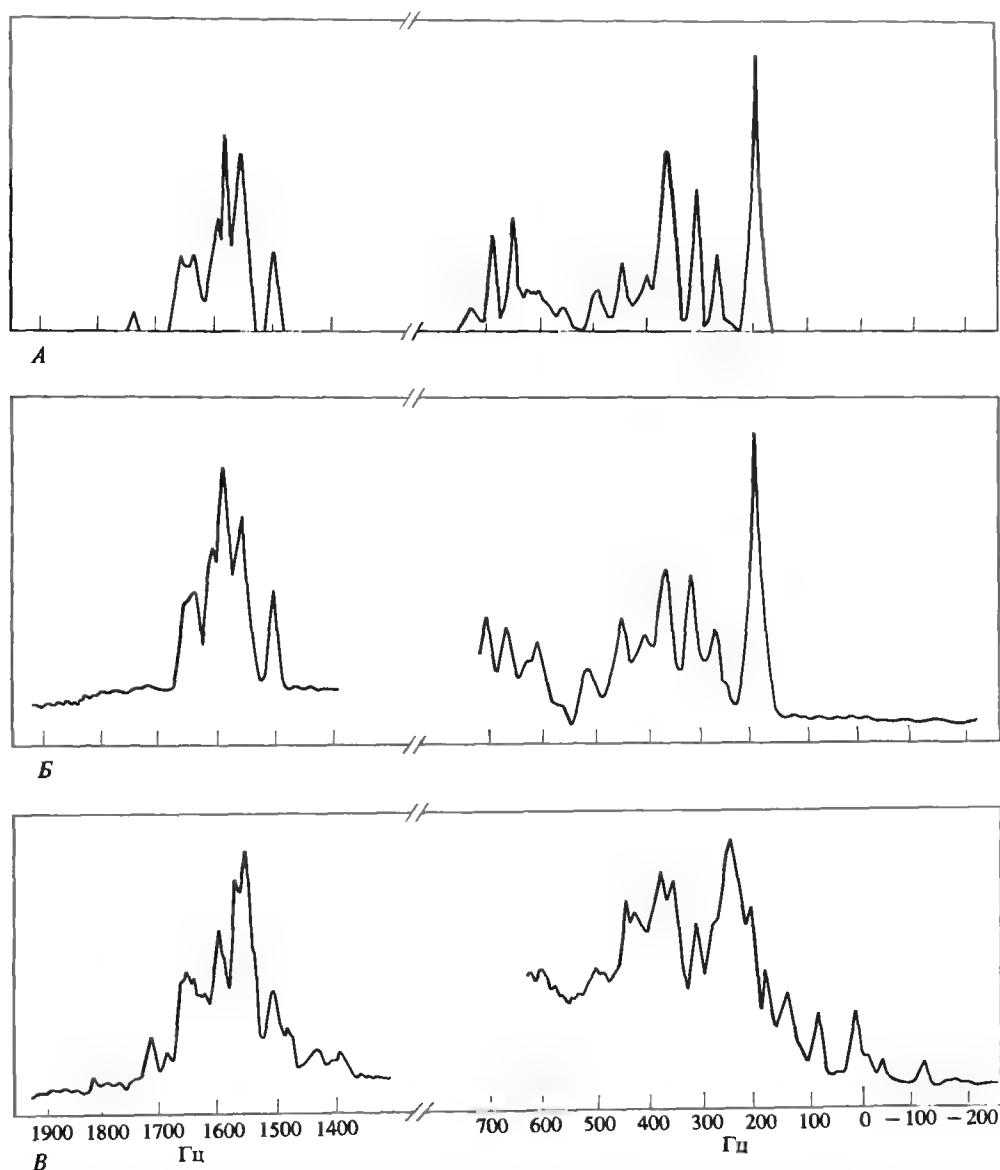


РИС. 9.20. Спектр лизоцима в D_2O (отложенные по оси абсцисс частоты отнесены к частоте для стандартного соединения ДСС). А. Спектр, построенный по данным об аминокислотном составе лизоцима. Б. Спектр денатурированного лизоцима, полученный при рабочей частоте 220 МГц. В. Спектр нативного лизоцима, полученный при рабочей частоте 220 МГц. (McDonald C.C., Phillips W.D. In: Fine Structure of Proteins and Nucleic Acids, ed. G.D.Fasman and S.N.Timasheff, New York, Dekker, 1970, p. 1.)

пример, для боковых групп гистидиновых остатков, у которых С-2-протоны обладают наибольшим химическим сдвигом по отношению к ДСС и четко регистрируются. (В сво-

РИС. 9.21. Спектр гистидиновых остатков рибонуклеазы А, снятый в D_2O при рабочей частоте 100 МГц. [Meadows D.H., Jardetzky O., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 61, 406 (1968).]



бодном гистидине химический сдвиг для С-2-протона равен 7,91 м.д., или около — 1740 Гц в спектре, полученном при 220 МГц. Небольшой хорошо разрешенный сигнал, отвечающий единственному гистидиновому остатку лизоцима, ясно виден в спектре, приведенном на рис. 9.20, А.)

Рибонуклеаза А содержит четыре гистидиновых остатка (подробнее об этом белке см. гл. 16). В нативном белке каждый из них имеет характерное магнитное окружение, и соответствующие линии хорошо разрешаются при рабочей частоте 100 МГц. Такой спектр представлен на рис. 9.21; сигналы от С-2-протонов четырех гистидиновых остатков пронумерованы от 1 до 4. Благодаря специальным экспериментальным подходам удалось соотнести все четыре линии с определенными остатками белковой последовательности. Как мы увидим позже (гл. 16), эта информация позволила значительно глубже понять механизм действия фермента, поскольку два из этих четырех остатков (His¹² и His¹¹⁹) принимают непосредственное участие в каталитическом акте.

Карбоксиметилирование либо His¹², либо His¹¹⁹ приводит к одновременному сдвигу ЯМР-сигналов 2 и 3; при этом положение сигналов 1 и 4 остается прежним. Следовательно, сигналы 2 и 3 отвечают остаткам His¹² и His¹¹⁹. Поскольку химическая модификация одного из гистидиновых остатков приводит к смещению обоих сигналов, представляется вероятным, что эти два остатка пространственно сближены (имеются данные, подтверждающие это предположение). Для установления происхождения линии 2 была применена специальная методика, основанная на водородном обмене (гл. 16).

Два других гистидиновых остатка — His⁴⁸ и His¹⁰⁵. Известно, что His⁴⁸ погружен в глубь белковой глобулы, поэтому линия 4 (с ее аномальными положением и шириной), по-видимому, отвечает именно этому остатку. Методом исключения получаем, что линия 1 соответствует остатку His¹⁰⁵. Эти результаты согласуются также с данными водородного обмена, приведенными в гл. 16.

Конечно, расшифровка ЯМР-спектра белка каждый раз представляет собой самостоятельную задачу; соответственно и методы, используемые при этом, могут различаться. Обычно для небольших белков известны и аминокислотная последовательность, и те остатки, которые составляют активный центр, поэтому удастся идентифицировать одну или более линий из числа наиболее хорошо разрешаемых. К тому же всегда можно упростить сложный спектр выборочным дейтерированием определенных аминокислот. Такие дейтерированные белки в случае бактерий получают, выращивая последние в среде, которая содержит определенные ²Н-аминокислоты.

¹³С-ЯМР-СПЕКТРЫ БЕЛКОВ

Природное содержание изотопа ¹³С составляет всего около 1,1% (см. табл. 9.1), а чувствительность регистрации — лишь 1,6% чувствительности для ¹Н (при одинаковом числе ядер и том же поле). Таким образом, ясно, что интенсивность линий, отвечающих ядрам ¹³С, пример-

но в 10^4 раз меньше, чем в случае протонов. Тем не менее достоинства ^{13}C -ЯМР-спектроскопии столь велики, что усилия, направленные на поиски методов увеличения интенсивности ^{13}C -линий, полностью себя оправдали.

Преимущества ^{13}C -ЯМР обусловлены несколькими причинами. Во-первых, значения химического сдвига для ^{13}C расположены в гораздо более широком диапазоне, чем в случае ^1H . Так, линия, отвечающая карбонильному атому углерода пептидной группы, смещена относительно стандартной линии для CS_2 на 16 — 26 м.д. в сторону более высоких полей, для α -углеродных атомов эта величина составляет 130 — 150 м.д., а для δ -углерода изолейцина — около 180 м.д. Даже среди α -углеродных атомов наблюдается заметное различие. Например, линия, отвечающая C^α , в пролине смещена относительно стандарта на 132 м.д., в аланине — на 142 м.д., а в глицине — на 150 м.д. В этом отношении ЯМР на ядрах ^{13}C существенно отличается от ЯМР на ядрах ^1H , где для всех аминокислот резонансные линии отстоят друг от друга не более чем на 8 м.д. Столь заметные различия в значениях химического сдвига для ^{13}C позволяют следить по отдельности за многими ядрами, принадлежащими к различным аминокислотам. Другим преимуществом ЯМР на ядрах ^{13}C (использующим необогащенные образцы) является фактическое отсутствие спин-спинового взаимодействия между ядрами ^{13}C , поскольку в большинстве случаев с ними соседствуют непарамагнитные ^{12}C -ядра. Это значительно упрощает спектр ЯМР.

Наконец, ^{13}C - и ^{12}C -атомы настолько сходны, что ^{13}C может повсеместно замещать обычный углерод. Таким образом, в отличие от специфически связывающихся парамагнитных зондов, обладающих заметным объемом, замена ^{12}C на ^{13}C не искажает геометрии исследуемой молекулы.

Трудности, связанные с низким природным содержанием ^{13}C , можно обойти путем обогащения образца этим изотопом. Имеется, однако, и другой недостаток ЯМР на ^{13}C , который несколько уменьшает потенциальные возможности этого метода даже в тех случаях, когда удастся получить хорошие спектры. Несмотря на большие различия в значениях химического сдвига для ^{13}C по сравнению с ^1H , чувствительность этого параметра к изменению окружения в случае ^{13}C значительно меньше. В результате различия, например, между спектрами ЯМР на ^{13}C для денатурированных и нативных белков оказываются менее выраженными, чем в случае спектров протонного резонанса, что затрудняет исследование конформационных изменений, взаимодействий с лигандами т.д. И все же в определенных ситуациях ЯМР на ^{13}C обладает очевидными преимуществами. Например, если надо проследить за превращениями определенного углеродного фрагмента в ходе биохимического процесса, то удобно использовать изотоп ^{13}C , а наблюдать за ним при помощи ЯМР.

За последние годы появилось несколько интересных работ по исследованию белков с помощью спектроскопии ЯМР на ^{13}C . Например, М. Ханкапиллар и др. (Hankapillar M.W. et al., 1972) для изучения механизма ферментативного катализа применили селективное обогащение ^{13}C по положению C-2 единственного гистидинового остатка в сериновой α -литической протеазе. Этот остаток входит в состав триады Asp—His—Ser, которая играет ключевую роль при функционировании сериновых протеаз.

Иного рода исследование, использующее ЯМР на ^{13}C природного содержания, предприняли К. Угурбил и др. (Ugurbil K. et al., 1977), которые сумели разрешить и идентифицировать линии в ЯМР-спектре, отвечающие множеству углеродных центров небольшого медьсодержащего белка азурина. [Для более подробного ознакомления с другими применениями ЯМР на ^{13}C можно обратиться к книге под редакцией Леви (Levy, 1976).]

ЯМР НА ЯДРАХ ^{31}P

Магнитная чувствительность для ^{31}P много меньше, чем для ^1H или ^{19}F (табл. 9.1), однако этот недостаток отчасти компенсируется тем, что значения химического сдвига

для ^{31}P весьма велики — они лежат в диапазоне до 500 м.д. Кроме того, в некоторых биологических объектах ^{31}P присутствует обычно в меньших количествах, чем ^1H или ^{13}C , и расшифровка спектра несколько облегчается благодаря меньшему числу линий в нем.

Некоторые работы по применению ЯМР на ^{31}P уже выполнены, но еще больше важных экспериментов предстоит провести. Одним из особенно интересных исследований такого рода является изучение при помощи ЯМР на ^{31}P внутриклеточных фосфатов. Такие исследования представляются вполне реальными, так как концентрация некоторых фосфатов в клетке (например, АТФ) достигает 1 мМ.

Примером может служить работа Р. Муна и Дж. Ричардса (Моон R.B., Richards J.H., 1973), где ЯМР на ^{31}P применялся для исследования 2,3-дифосфоглицерата (ДФГ) в цельной крови кролика и в гемолизате. Обеим фосфатным группам ДФГ отвечают хорошо разрешимые линии. Поскольку значения химического сдвига для Р-2 и Р-3 зависят от состояния ионизации соответствующих фосфатов, при помощи ЯМР удается определить рН внутри клетки. Другим примером является исследование с помощью ЯМР на ^{31}P гликолиза и биоэнергетики анаэробных клеток *E.coli* (Ugurbil et al., 1978).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ^{19}F В КАЧЕСТВЕ ЗОНДА ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ БИОХИМИЧЕСКИХ СИСТЕМ

При данном магнитном поле магнитная чувствительность для фтора близка к чувствительности для ^1H (табл. 9.1), а значения константы взаимодействия и химического сдвига для ядер фтора значительно выше (в 10 раз и более), чем для ^1H . Кроме того, ядро атома ^{19}F обладает относительно малыми размерами. Все это приводит к тому, что ^{19}F является по своим свойствам идеальным специфически связывающимся зондом. Иллюстрацией этому может служить исследование РНКазы S¹⁾, выполненное У. Хестисом и М. Рафтери (W.H. Huestis, M.A. Raftery), которые изучали связывание Lys¹ и Lys⁷ S-пептида с трифторацетилом (ТФА). В ходе этой реакции образуется смесь, в которой одни полипептидные молекулы присоединены к ТФА через ε -аминогруппы Lys¹ и Lys⁷, а другие — также с помощью α -аминогруппы Lys¹.

На рис. 9.22 приведен спектр ЯМР связанного с ТФА S-пептида, в котором ясно видны три линии — К, L и М. Исследования модельных соединений позволяют отнести линию L к ТФА, связанному с ε -аминогруппой Lys⁷, и к моно-ТФА-Lys¹, а линии К и М — к дважды ацетилированному, по α - и ε -положениям, Lys¹. В РНКазе S линия L расщепляется на две (L' и L''). Дальнейшие исследования показали, что линия L' отвечает ТФА, связанному с ε -аминогруппой Lys⁷, а L'' — ε -аминогруппе монозамещенного Lys¹. Таким образом, ЯМР на ^{19}F оказывается достаточно чувствительным, чтобы различить в модифицированном белке две ε -аминогруппы, разделенные всего несколькими остатками. Следует также отметить, что ^{19}F -меченные ферменты сохраняют свою активность, т.е. их структура существенно не меняется.

Рис. 9.23 приводит спектры ^{19}F -меченной РНКазы S в присутствии и в отсутствие различных ингибиторов. Линия L' смещается в сторону более высоких полей и в некоторых случаях расщепляется на две компоненты. Мы не будем здесь анализировать этот результат; отметим лишь, что как в этом, так и в других примерах наблюдается высокая магнитная чувствительность для ^{19}F , делающая его весьма полезным зондом.

¹⁾ Рибонуклеаза S (РНКазы S) — это модифицированная форма рибонуклеазы А, в которой разорвана пептидная связь между 20-м и 21-м остатками. Образующиеся при этом два полипептида (остатки 1 — 20 и 21 — 124) удерживаются вместе с помощью нековалентных связей. Первый из них называется S-пептидом, а второй — S-белком. (Подробнее см. гл. 16.)

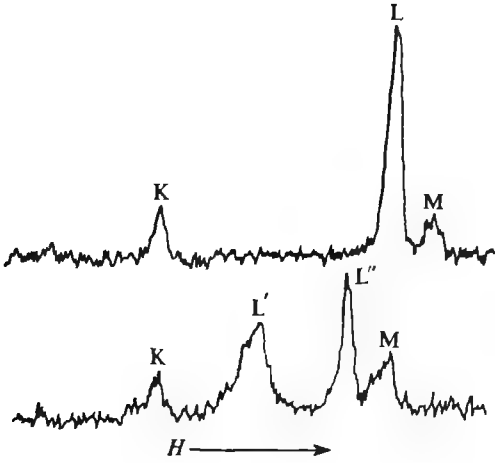


РИС. 9.22. Спектр ЯМР на ^{19}F S-пептида, связанного с ТФА (вверху), и S-пептида, связанного с S-белком (внизу). [Huestis W.H., Raftery M.A., Biochemistry, **10**, 1181 (1971).]

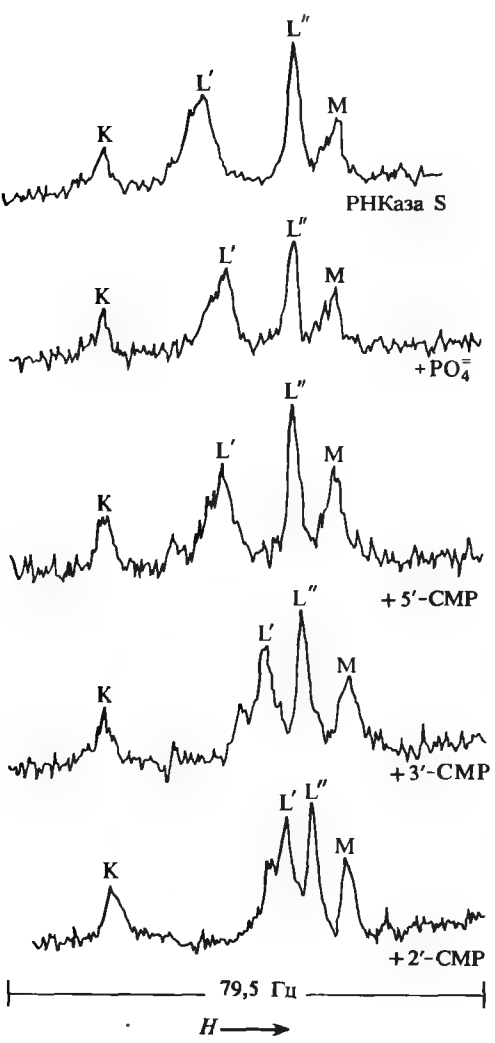
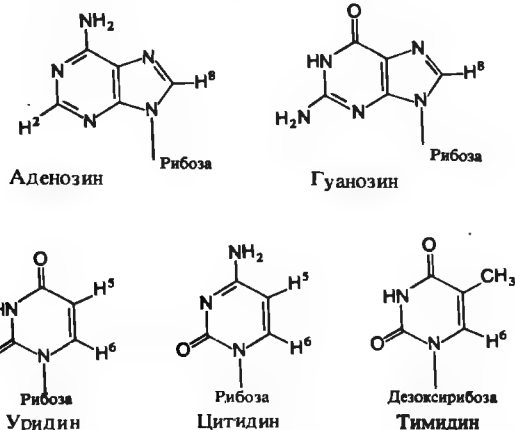


РИС. 9.23. Спектр ЯМР на ^{19}F рибонуклеазы S, связанной с ТФА, в отсутствие (вверху) и в присутствии различных ингибиторов. [Huestis W.H., Raftery M.A., Biochemistry, **10**, 1181 (1971).]

СПЕКТРЫ ЯМР НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Метод протонного магнитного резонанса на уровне моно- и олигонуклеотидов позволяет получить много ценной информации о таких особенностях строения нуклеиновых кислот, как стэкинг и спаривание оснований, взаимная ориентация оснований и сахаров и т.п. В случае полимеров с большой молекулярной массой ситуация усложняется тем, что нуклеиновые кислоты состоят преимущественно из четырех нуклеотидных единиц, каждая из которых встречается в молекуле много раз. Поэтому соответствующая часть спектра представляет собой результат наложения сигналов от оснований данного типа, расположенных на разных участках цепи. Кроме того, возникает обычная для жестких макромолекул проблема значительного уширения линий.

Пуриновые и пиримидиновые основания содержат по два неспособных к обмену протона, которые могут служить зондами. В пуринах это протоны Н-2 и Н-8, а в пиримидинах — Н-5 и Н-6. Кроме того, имеются протоны метильной группы тимидинового кольца.



В свободных мононуклеотидах химический сдвиг для протонов Н-2 и Н-8 пуриновых оснований в D_2O составляет 8,4 — 9,0 м.д., для Н-5 пиримидинов он равен от 6,3 до 6,6 м.д., для Н-6 — от 8,0 до 8,5 м.д., а для протонов метильной группы тимидина — от 2,3 до 2,4 м.д. Таким образом, необменивающимся протонам соответствуют ЯМР-сигналы, лежащие в интервале от 2 до 9 м.д.

Протоны, участвующие в образовании уотсон-криковских водородных связей, не дают сигнала в D_2O , поскольку они замещаются на дейтерий. Для регистрации ЯМР-спектров этих протонов используют неводные растворители. На рис. 9.24. представлены спектры 1-метилцитозина, 9-этилгуанина и смеси 1:1 этих оснований в диметилсульфоксиде, полученные при рабочей частоте 60 МГц. В случае 1-метилцитозина протонам аминогруппы отвечает хорошо разрешаемый пик; сигналы от Н-5 и Н-6 расщеплены до дублетов из-за спин-спинового взаимодействия. ЯМР-сигналы, отвечающие протонам NH- и NH_2 -групп 9-этилгуанина, достаточно далеко отстоят от сигнала Н-8. В спектре смеси оснований ЯМР-сигналы, отвечающие протонам NH_2 -группы 1-метилцитозина и NH- и NH_2 -группам 9-этилгуанина, сдвинуты в сторону более слабых полей. Эти спектры свидетельствуют об образовании в растворе уотсон-криковских пар оснований. Исследования, проведенные в неводных растворах, указывают на образование пар А-Т и на отсутствие спаривания в смесях G + Т и А + G.

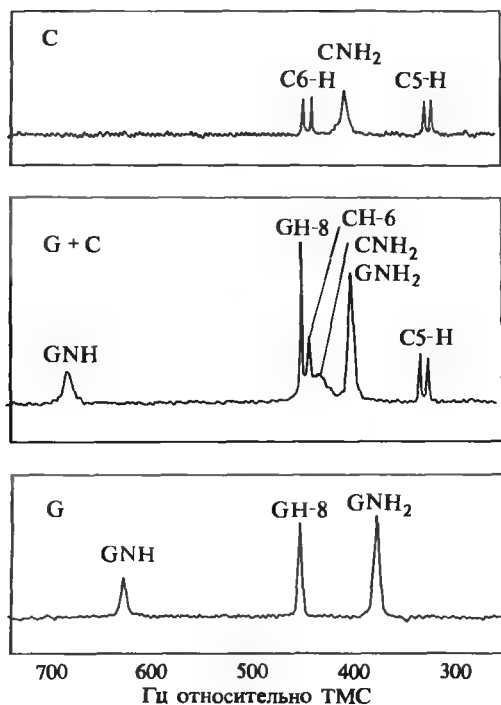


РИС. 9.24. Спектры ЯМР 9-этилгуанина (G), 1-метилцитозина (C) и их смеси в диметилсульфиде. Спектры сняты при рабочей частоте 60 МГц. [Shoup R.R. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 23, 194 (1966).]

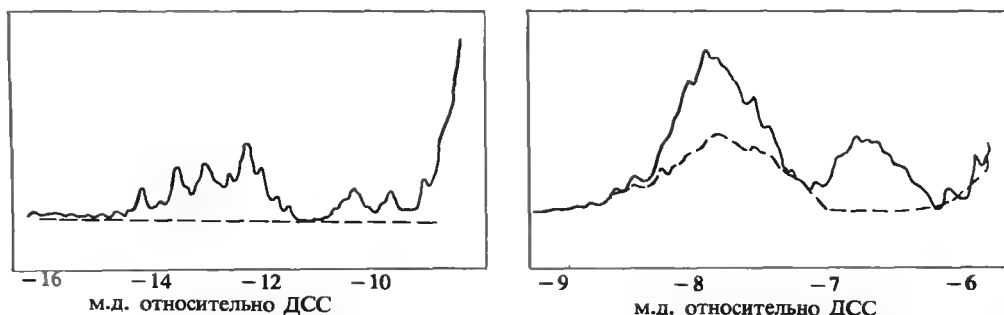


РИС. 9.25. Спектры ЯМР протонов дрожжевой тРНК^{Phe} при 35°C, снятые при рабочей частоте 220 МГц. Сплошные кривые — спектры в H₂O, пунктирные — в D₂O. [Wong Y.P. et al., J. Mol. Biol., 72, 725 (1972).]

Из спектров ЯМР трудно извлечь принципиально новую информацию о высокомолекулярных нуклеиновых кислотах в водном растворе, однако один пример весьма плодотворного применения ЯМР в этой области можно привести: речь идет об исследовании транспортной РНК. Одной из причин успешного изучения этой молекулы послужил ее относительно небольшой размер (70 — 80 нуклеотидов). Другой причиной явилось то обстоятельство, что вопреки обычной практике более информативными в этом случае оказались спектры, снятые в H₂O, а не в D₂O. Как правило, в таких исследованиях ЯМР-спектры

H_2O , состоящие из большого числа сигналов, налагаются на спектры протонного резонанса, но в данном случае сигналы, отвечающие атомам водорода, которые участвуют в образовании водородных связей, оказались смещенными в сторону более низких полей.

На рис. 9.25 приведены спектры фенилаланиновой дрожжевой тРНК при 35°C . Эти спектры взяты из работы Д. Кирнса, Б. Рейда и Р. Шульмана — исследователей, весьма интенсивно изучавших тРНК с помощью ЯМР. Приведены спектры, снятые как в H_2O , так и в D_2O . В H_2O сигналы в области $-11,5 \div -15$ м.д. (стандарт — ДСС) порождаются атомами водорода, участвующими в образовании уотсон-криковских связей между основаниями. В спектрах, снятых в D_2O , эти сигналы отсутствуют, что свидетельствует о замещении указанных атомов дейтерием. Систематические исследования слабopольной области позволили установить многие особенности структуры тРНК в растворе (см. гл. 24).

9.7. Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР)

СХОДСТВО МЕЖДУ ЭПР И ЯМР

За последнее десятилетие электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) (называемый также электронным спиновым резонансом) получил в биофизической химии широкое распространение. Этот метод основан на наличии у неспаренного электрона магнитного момента. В магнитном поле неспаренный электрон, спиновое квантовое число которого равно $S = \frac{1}{2}$ ($m_s = \pm \frac{1}{2}$), прецессирует вокруг направления поля (ось z), причем его момент количества движения либо параллелен ($m_s = +\frac{1}{2}$), либо антипараллелен ($m_s = -\frac{1}{2}$) этой оси. Переменное магнитное поле, направленное под прямым углом к оси z , вызывает переходы между двумя спиновыми состояниями, если частота поля близка к ларморовой частоте прецессирующего электрона.

Из анализа уравнений (9.1) — (9.11) мы знаем, что круговая частота прецессии равна $\omega = -\gamma H$, где γ — гиромагнитное отношение. Параметр γ определяется как $\gamma = -g\beta_e/\hbar$ [см. уравнения (9.8.) и (9.10) и их обсуждение]. Нам известно также, что ядерный магнетон более чем на три порядка меньше магнетона Бора электрона. Величина g для свободного электрона составляет 2,00232. Таким образом, для свободного электрона $\gamma = -1,7 \cdot 10^7 \text{ рад} \cdot \text{Гс}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, что по абсолютной величине в 10^3 или более раз превосходит значения γ для ядер (табл. 9.1). Это означает, что при данном магнитном поле резонансная частота для неспаренного электрона обычно в 10^3 раз превышает частоты, используемые в ЯМР. Следовательно, если эксперименты по ЯМР проводятся в диапазоне мегагерц, то эксперименты по ЭПР требуют рабочих частот порядка гигагерц ($1 \text{ ГГц} = 10^9 \text{ колебаний} \cdot \text{с}^{-1} = 10^3 \text{ МГц}$).

Хотя рабочие частоты, используемые в ЯМР и ЭПР, заметно различаются, полученные ранее уравнения ЯМР (в частности, уравнения Блоха) и их следствия применимы и к ЭПР, т.е. такие параметры, как время продольной (T_1) и поперечной (T_2) релаксации, играют ключевую роль при установлении природы сигнала ЭПР. Однако некоторые особенности ЭПР заслуживают специального рассмотрения; к ним мы сейчас и перейдем.

СВЕРХТОНКОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ

Рассмотрим неспаренный электрон, находящийся во внешнем магнитном поле $\mathbf{H}$. Локальные постоянные поля $\Delta\mathbf{H}_{\text{лок}}$, создаваемые окружением электрона, суммируясь с $\mathbf{H}$, дают эффективное поле $\mathbf{H}_{\text{эфф}}$. Эти локальные поля обычно связаны с наличием ядер, обладающих магнитным моментом. Когда электрон локализован преимущественно вблизи одного ядра со спином I , проекция $\Delta\mathbf{H}_{\text{лок}}$ на направление внешнего поля может прини-

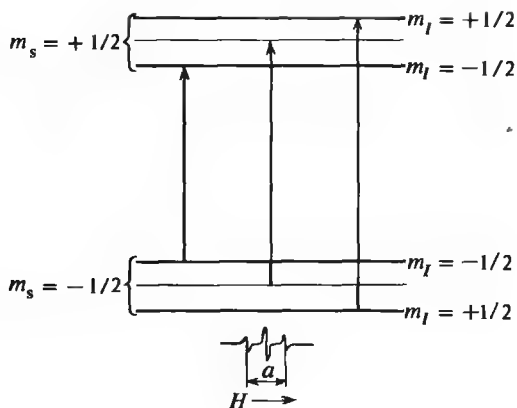


РИС. 9.26. Изменение спиновых состояний электрона для случая $I = 1/2$ (жирные линии); тонкими линиями показана ситуация, когда $a = 0$. Внизу — порождаемый этими переходами спектр ЭПР.

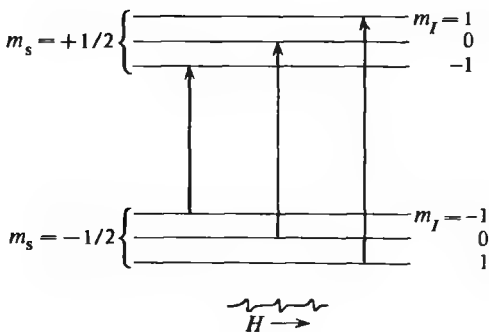


РИС. 9.27. Изменение спиновых состояний электрона для случая $I = 1$. Внизу — соответствующий спектр ЭПР.

мать $2I + 1$ значений, отвечающих $2I + 1$ значениям магнитного спинового квантового числа ядра m_I . Следовательно, резонанс будет наблюдаться при $2I + 1$ значениях $H_{\text{рез}}$, которые определяются как

$$H_{\text{рез}} = H_{\text{рез}}^0 - a m_I, \quad \text{где } m_I = -I, -I + 1, \dots, I - 1, I \quad (9.46)$$

Здесь a — постоянная, такая, что произведение aI равно величине локального поля, а $H_{\text{рез}}^0$ — значение поля, при котором наблюдался бы резонанс, если бы a было равно нулю.

В качестве примера рассмотрим атом водорода, для которого $I = 1/2$. В этом случае резонанс неспаренного электрона будет наблюдаться при $H_{\text{рез}}^0 - a/2$ и при $H_{\text{рез}}^0 + a/2$. На рис. 9.26 изображены происходящие при этом переходы. Если $a = 0$, то имеется всего один переход; при a , отличном от нуля, имеют место два перехода. Эти переходы отвечают изменению спинового квантового числа электрона ($m_s = \pm 1/2$; $|\Delta m_s| = 1$) при неизменном m_I ; иными словами, переходы между спиновыми состояниями электрона происходят при неизменной ориентации ядер. В нижней части рис. 9.26 приведен спектр ЭПР¹⁾. Расстояние между двумя крайними пиками равно a . Параметр a называется *константой сверхтонкого расщепления* и измеряется в гауссах. Обычно его значение много меньше

¹⁾ Спектры ЭПР принято представлять в виде зависимости первой производной поглощения от поля H . Это облегчает их интерпретацию, обычно основанную на детальном анализе формы ЭПР-сигналов и точном измерении констант сверхтонкого расщепления.

значения приложенного поля и составляет десятки или сотни гаусс, в то время как внешнее поле равно тысячам гаусс.

В качестве следующего примера на рис. 9.27 рассмотрен случай $I = 1$ (ситуация, отвечающая атому азота). В спектре наблюдаются три линии, отвечающие трем значениям m_I . В более общем случае взаимодействия электрона с n эквивалентными ядрами будет наблюдаться $2nI + 1$ линий. Таким образом, если электрон взаимодействует с 10 эквивалентными протонами, то в спектре должно появиться 11 линий. Однако некоторые из них не будут разрешены, а сольются в одну широкую полосу. Это явление называется неоднородным уширением линий и характерно для спектров ЭПР молекул, где неспаренный электрон в значительной степени делокализован (как в ароматических соединениях).

КОНТАКТНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ

К сверхтонкому расщеплению линий приводят два типа сверхтонкого взаимодействия. Одно из них называется *контактным взаимодействием* или *взаимодействием Ферми*. Оно имеет квантовомеханическую природу и зависит от вероятности пребывания электрона на ядре. Это взаимодействие изотропно (не зависит от ориентации), и поэтому его иногда называют изотропным сверхтонким взаимодействием. Из квантовой механики известно, что вероятность для электрона оказаться на ядре пропорциональна квадрату соответствующей волновой функции в точке, отвечающей координатам ядра. Для электронов s -орбиталей эта вероятность отлична от нуля. Однако волновые функции электронов, находящихся на p -, d -, f - и более высоких орбиталях, имеют в точке с координатами ядра узлы, так что вероятность нахождения электрона в этой точке равна нулю и контактное взаимодействие отсутствует.

Сверхтонкое взаимодействие другого типа зависит от ориентации и известно под названием *анизотропного сверхтонкого взаимодействия*. Его природу можно объяснить в рамках классической физики, и в нем участвуют не только s -электроны. В случае быстро вращающихся молекул анизотропное взаимодействие в результате усреднения обращается в нуль, и роль играет лишь изотропное (контактное) взаимодействие. Эту ситуацию мы прежде всего и рассмотрим, а к анизотропному взаимодействию обратимся позже.

Для атома водорода энергию контактного взаимодействия можно записать в виде

$$\text{Энергия контактного взаимодействия} = h A m_s m_I \quad (9.47)$$

где m_s и m_I — магнитные спиновые квантовые числа электрона и ядра соответственно, A — частота, которую можно найти, зная квадрат волновой функции на ядре¹⁾. Для системы с одним неспаренным электроном и одним ядром, т.е. для $S = 1/2$ и $I = 1/2$, характерны четыре значения энергии контактного взаимодействия, отвечающие четырем возможным сочетаниям чисел $m_s = \pm 1/2$ и $m_I = \pm 1/2$. Энергия парамагнитного электрона в магнитном поле составляет

$$\begin{aligned} E &= -\mu_m \cdot H \\ &= -(1/2)g\beta_e H \quad \text{для } m_s = -1/2 \\ &= +(1/2)g\beta_e H \quad \text{для } m_s = +1/2 \end{aligned} \quad (9.48)$$

¹⁾ Выражение (9.47) дает величину слагаемого $H_{\text{конт}}$, отвечающего контактной энергии в гамильтониане в случае сильного магнитного поля. В более общем виде его можно записать как $H_{\text{конт}} = h A S \cdot I$, где S и I — операторы спина электрона и ядра. Можно показать, что при сильных магнитных полях это соотношение сводится к (9.47) (см. Swartz et al., 1972).

[Сравните уравнение (9.48) с уравнением (9.16), имея в виду, что $\gamma = -g\beta_e/\hbar$.] В сильном магнитном поле эта энергия в 10^3 раз и более превышает энергию контактного взаимодействия. Для каждого из состояний ($m_s = +1/2$ или $m_s = -1/2$) возможны две ориентации ядерного спина; выражения для энергии четырех уровней (в порядке ее убывания) могут быть записаны в виде

$$\begin{aligned} E &= +(1/2)g\beta_e H + hA/4 && \text{для } m_s = +1/2 \text{ и } m_I = +1/2 \\ &= +(1/2)g\beta_e H - hA/4 && \text{для } m_s = +1/2 \text{ и } m_I = -1/2 \\ &= -(1/2)g\beta_e H + hA/4 && \text{для } m_s = -1/2 \text{ и } m_I = -1/2 \\ &= -(1/2)g\beta_e H - hA/4 && \text{для } m_s = -1/2 \text{ и } m_I = +1/2 \end{aligned} \quad (9.49)$$

Согласно сказанному ранее, переход электрона из одного спинового состояния в другое в результате поглощения им энергии совершается при неизменном m_I . (Разумеется, m_I изменится, если частота осциллирующего поля совпадет с резонансной частотой ядра.) Следовательно, имеют место два перехода. Этим переходам отвечают в спектре ЭПР две линии, которые отстоят друг от друга по частоте на величину A . Параметр A представляет собой константу сверхтонкого взаимодействия. Из уравнения (9.49) легко видеть, что изменения энергии в случае этих переходов составляют

$$\begin{aligned} \Delta E &= g\beta_e H + (1/2)hA && \text{для } m_I = +1/2 \\ &= g\beta_e H - (1/2)hA && \text{для } m_I = -1/2 \end{aligned} \quad (9.50)$$

На опыте спектры ЭПР обычно получают путем изменения поля при неизменной рабочей частоте до тех пор, пока не будет достигнут резонанс. При этом $\Delta E = h\nu_0$, а $H = H_{\text{рез}}$. Подставляя эти соотношения в уравнение (9.50), получим

$$H_{\text{рез}} = (h\nu_0/g\beta_e) \pm (1/2)(h/g\beta_e)A \quad (9.51)$$

Таким образом, резонанс будет наблюдаться при двух разных значениях поля. Сравнение уравнений (9.51) и (9.46) показывает, что при $I = 1/2$ $h\nu_0/g\beta_e = H_{\text{рез}}^0$, и $a = (h/g\beta_e)A$.

АНИЗОТРОПНОЕ СВЕРХТОНКОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ

Как упоминалось ранее, величину анизотропного взаимодействия можно найти, не прибегая к квантовомеханическому анализу. Рассмотрим ядро с магнитным моментом μ_{mn} , находящееся на расстоянии r от парамагнитного электрона, причем r составляет с направлением поля угол θ (рис. 9.28). В Дополнении 9.3 показано, что z -составляющую локального поля $\Delta H'_{\text{лок}}$, порождаемого моментом μ_{mn} , можно представить в первом приближении в виде

$$\Delta H'_{\text{лок}} = (\mu_{\text{mn}z}/r^3)(3 \cos^2 \theta - 1) \quad (9.52)$$

где $\mu_{\text{mn}z}$ — z -составляющая момента μ_{mn} , которая может принимать $2I + 1$ значений. В отсутствие изотропного сверхтонкого взаимодействия сверхтонкое расщепление будет определяться исключительно анизотропным эффектом, так что, например, величина $H'_{\text{лок}}$ в выражении (9.52) будет соответствовать сверхтонкому расщеплению $a m_I$, входящему в уравнение (9.46).

Дополнение 9.3.

МАГНИТНОЕ ПОЛЕ ВБЛИЗИ МАГНИТНОГО ДИПОЛЯ

В Дополнении 5.1. мы вывели приближенное выражение для электрического поля E_A на расстоянии r от электрического диполя μ_A . z -Составляющая этого поля равна (при $\mu_{Ax} = \mu_{Ay} = 0$)

$$[(3z^2/r^5) - (1/r^3)](\mu_{Az}/\epsilon)$$

где μ_{Az} — это z -составляющая μ_A . Точно так же z -составляющая магнитного поля на расстоянии r от магнитного диполя μ_{mn} примерно равна (при $\mu_{mnx} = \mu_{mny} = 0$)

$$[(3z^2/r^5) - (1/r^3)]\mu_{mnz}$$

где μ_{mnz} — z -составляющая μ_{mn} . Поскольку $z^2/r^2 = \cos^2\theta$, где θ — угол между осью z и r (см. рис. 9.28), то z -составляющая магнитного поля диполя будет определяться уравнением (9.52).

При $I = 1$ наблюдаются три линии сверхтонкой структуры, которые соответствуют трем значениям μ_{mnz} . Однако ширина их чувствительна к распределению парамагнитных центров по углу θ . Если парамагнитные центры находятся в нескольких фиксированных положениях, то, как следует из уравнения (9.52), каждому из них отвечает свое значение поля $\Delta H'_{\text{лок}}$, характеризующееся определенным углом ориентации θ . В результате резонанс наблюдается в некоторой области значений приложенного поля, поскольку истинные поля, в которых находятся молекулы, зависят от ориентации последних. В предельном случае твердого стекла или порошка реализуются все возможные ориентации парамагнитных центров и связанные с ними локальные поля ($\Delta H'_{\text{лок}}$), в результате чего наблюдается очень широкая линия. С другой стороны, если молекулы быстро изменяют

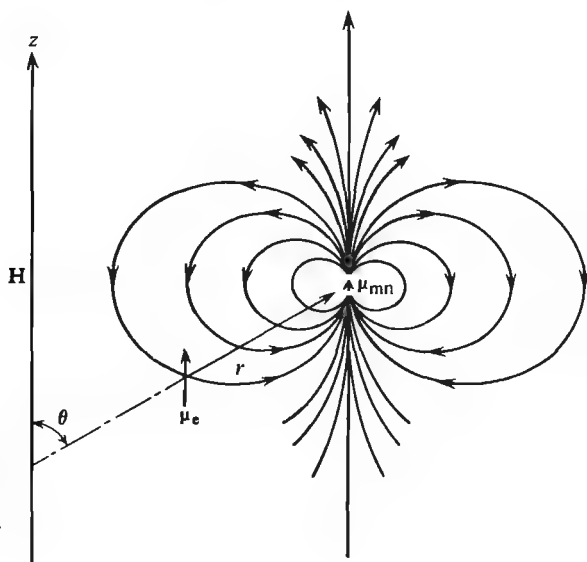


РИС. 9.28. Взаимодействие магнитных диполей электрона (μ_e) и ядра (μ_{mn}). Изображены силовые линии магнитного поля, создаваемого ядром с магнитным моментом μ_{mn} .

свою ориентацию и за достаточно короткий промежуток времени успевают реализоваться фактически все возможные значения θ , величину $\cos^2 \theta$ можно заменить ее усредненным значением $1/3$ и, значит, $\Delta H'_{\text{лок}} = 0$. В этом случае анизотропное сверхтонкое взаимодействие отсутствует, и наблюдаемые спектры характеризуются только изотропной компонентой сверхтонкого взаимодействия.

В качестве иллюстрации этих рассуждений на рис. 9.29 приведены спектры ди-*трет*-бутилнитроксильного радикала, снятые при двух разных условиях. Верхний спектр отвечает радикалу в жидком этаноле при 292 К, радикал в этих условиях совершает быстрые беспорядочные движения и, следовательно, анизотропный вклад в сверхтонкое взаимодействие отсутствует. При этом сохраняются три ЭПР-линии, порождаемые изотропным сверхтонким взаимодействием ядра атома азота и неспаренного электрона. Нижний спектр отвечает тому же радикалу, но в застеклованном образце при 77 К. Линии заметно уширены и плохо разрешены, а также немного сдвинуты относительно линий первого спектра. Ясно, что в стекле анизотропный вклад в сверхтонкое взаимодействие оказывается достаточно большим и существенно меняет спектр.

Приведенные рассуждения иллюстрируют концепцию анизотропного сверхтонкого взаимодействия. Локальное поле, порождаемое анизотропным взаимодействием, можно выразить через константу расщепления a подобно тому, как это было сделано в уравнении (9.46) при обсуждении изотропного сверхтонкого взаимодействия. Однако анизотропное сверхтонкое взаимодействие должно представляться в виде тензоров. Часто удается выделить такую систему координат (систему главных осей), в которой тензорное описание сводится к описанию при помощи трех констант расщепления: a_x , a_y и a_z . Эти константы характеризуют анизотропное взаимодействие вдоль трех главных осей системы (x , y и z). В радикалах, обладающих аксиальной симметрией, оси x и y эквивалентны, так что $a_x = a_y \neq a_z$. В этом случае имеются две константы анизотропного сверхтонкого расщепления, $a_{\parallel}$ и $a_{\perp}$, которые отвечают двум значениям $\Delta H'_{\text{лок}}$ в уравнении (9.52) (при $\theta = 0^\circ$ и $\theta = 90^\circ$ соответственно).

Чтобы более полно проиллюстрировать эти положения, рассмотрим структуру ди-*трет*-бутилнитроксильного радикала, изображенную на рис. 9.30. Неспаренный электрон в этом соединении локализован преимущественно на $2p\pi$ -орбитали, расположенной вдоль оси z , поэтому имеется сильное анизотропное сверхтонкое взаимодействие с практически аксиальной симметрией. На рисунке изображена система главных осей молекулы, каждой из которых отвечает свой параметр сверхтонкого взаимодействия с ядром: a_x , a_y и a_z . Эти параметры можно определить из измерений, проведенных на ориентированных кристаллах, если последовательно направлять магнитное поле вдоль каждой из трех главных осей молекулы. В табл. 9.3. представлены результаты таких измерений, которые ясно свидетельствуют о зависимости указанных параметров от ориентации; эта зависимость особенно заметна при сравнении величины a_z , с одной стороны, и a_x и a_y — с другой. Кроме того, в таблице приведено значение константы изотропного сверхтонкого

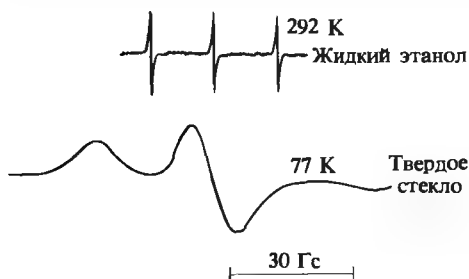


РИС. 9.29. Спектр ди-*трет*-бутилнитроксильного радикала в жидком этаноле и в твердом стекле. (Bolton J.R. In: Biological Application of Electron Spin Resonance, ed H.M.Swartz, J.R.Bolton, D.C.Borg, New York, Wiley — Interscience, 1972, p.37.)

расщепления a_0 . Она равна константе взаимодействия для этого же радикала в растворе, где быстрое вращение приводит к исчезновению анизотропного вклада и

$$a_0 = (1/3)(a_x + a_y + a_z)$$

Измеренное значение a_0 , которое приведено в табл. 9.3, близко к значению, полученному при помощи этого уравнения с использованием экспериментальных значений a_x , a_y и a_z ¹⁾.

Таблица 9.3

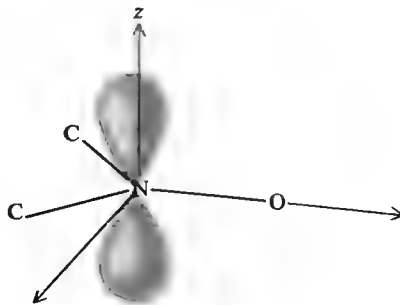
ПАРАМЕТРЫ ЭПР НИТРОКСИЛЬНОГО РАДИКАЛА^{1), 2)}

g_x	g_y	g_z	a_x	a_y	a_z	g_0	a_0
2,0089	2,0061	2,0027	$7,1 \pm 0,5$	$5,6 \pm 0,5$	$32,0 \pm 1,5$	$2,0060 \pm 0,0002$	$15,1 \pm 0,5$

¹⁾ Griffith O.H., Cornell D.W., McConnell H.M., J. Chem. Phys., 43, 2909 (1965).

²⁾ Экспериментальная ошибка при определении g составляет $\pm 0,0003$. Значения a приведены в гауссах. Величины, отвечающие различным ориентациям магнитного поля, измерены для монокристаллов, величины g_0 и a_0 — для раствора.

РИС. 9.30. Структура нитроксильного радикала. Изображена $2p\pi$ -орбиталь. Предполагается, что два атома углерода, атом азота и атом кислорода лежат в одной плоскости.



АНИЗОТРОПИЯ g -ФАКТОРА

Энергия неспаренного электрона в магнитном поле зависит от параметра g . Как упоминалось ранее, значение этого параметра для свободного электрона составляет 2,00232. Однако локальные внутренние поля могут вызывать отклонения величины g от приведен-

¹⁾ Заметим, что параметры a_x , a_y и a_z , полученные для ориентированных кристаллов (табл. 9.3), включают как изотропные, так и анизотропные составляющие. Используя уравнение (9.52) для вычисления трех чисто анизотропных параметров, можно легко показать, что их сумма равна нулю.

Как отмечалось ранее, квадрат волновой функции электрона, находящегося на p -орбитали и локализованного у одного из ядер, обращается на ядре в нуль, и, следовательно, изотропное сверхтонкое взаимодействие отсутствует. Но для электрона $2p\pi$ -молекулярной орбитали нитроксильного радикала волновая функция является линейной комбинацией волновых функций для атомных орбиталей кислорода и азота. Квадрат атомной волновой функции кислорода обращается в нуль на ядре атома кислорода, но не на ядре атома азота. Это же справедливо для волновой функции орбитали азота. Следовательно, квадрат линейной комбинации волновых функций атомных орбиталей отличен от нуля на ядре азота, и изотропное сверхтонкое взаимодействие с этим ядром не равно нулю ($I = 1$). (Заметим, что для кислорода $I = 0$; см. табл. 9.1.)

ного значения. Кроме того, g , вообще говоря, зависит от ориентации молекулы по отношению к внешнему магнитному полю. В общем случае g , подобно ядерному сверхтонкому взаимодействию, представляется в виде тензора. Однако в системе главных осей для описания анизотропии g -фактора требуются лишь три параметра: g_x , g_y и g_z . Они соответствуют тем значениям g -фактора, которые имеют место в ориентированных кристаллах, когда магнитное поле направлено вдоль осей x , y или z . Для молекулы, обладающей подлинной аксиальной симметрией, $g_x = g_y \neq g_z$. Здесь для описания анизотропии необходимы только два параметра — $g_{\perp}$ (соответствует g_x и g_y) и $g_{\parallel}$ (соответствует g_z).

Приведенные в табл. 9.3 значения g получены при исследовании тех же ориентированных кристаллов, что и при измерении a_x , a_y и a_z . Заметим, что различия между параметрами g_x , g_y и g_z значительно меньше, чем между константами анизотропного сверхтонкого расщепления. В таблице приводится также значение g_0 , измеренное для быстро вращающихся молекул. Этот параметр определяется как

$$g_0 = (1/3)(g_x + g_y + g_z)$$

и g_0 , измеренное для радикала в растворе, хорошо согласуется со значением, полученным с помощью этой формулы с использованием величин g_x , g_y и g_z , которые были измерены для радикала в ориентированных кристаллах.

ИССЛЕДОВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ ЭПР МЕТАЛЛСОДЕРЖАЩИХ БЕЛКОВ

Далеко не все биологические молекулы обладают неспаренным электроном, но некоторые белки содержат парамагнитные ионы металлов, которые играют важную роль в их функционировании и в формировании структуры. При исследовании таких белков ЭПР оказывается особенно ценным методом. В спектрах протонного резонанса сигналы от множества ядер располагаются в относительно узком спектральном интервале. В спектрах ЭПР проблема наложения разных сигналов устраняется автоматически, поскольку имеется лишь один источник сигналов — ион металла вместе с его окружением. В сущности этот ион является естественной меткой.

Исследованиям металлсодержащих белков с помощью ЭПР посвящена обширная литература. Интересующийся читатель может обратиться, например, к работам Бейнерта (Beinert), посвященным флавопротеидам и железосерным белкам, к работам Ваннгарда (Vännngard) о медьсодержащих белках (см. Swartz et al., 1972), а также Ф. Боудена (Bowden F.L., 1975), посвященным некоторым молибденсодержащим ферментам.

ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДОМ ЭПР С ПРИМЕНЕНИЕМ СПИНОВОЙ МЕТКИ

Большинство биологических молекул не содержат неспаренных электронов и потому не могут давать сигнала ЭПР. Для исследования этих молекул методом ЭПР к ним присоединяют один или несколько радикалов, известных под названием спиновых меток. Таким образом, спиновая метка — это искусственный зонд, своего рода репортерская группа. При введении таких групп нужно убедиться в том, что свойства исследуемой молекулы существенно не меняются. Для этого, например, можно измерить биологическую активность исследуемых молекул (скажем, каталитическую активность фермента) или проследить за другими их свойствами в присутствии и в отсутствие спиновой метки. Если эти контрольные измерения показывают, что конформация или активность молекулы не меняется незначительно, то с известной долей уверенности можно утверждать, что исследования с помощью спиновой метки дают достоверную информацию о состоянии системы.

Чаще всего применяются спиновые метки, содержащие нитроксильный радикал (см. рис. 9.29). Будучи включенными в соответствующий участок молекулы, эти спино-

вые метки позволяют исследовать структуру и динамические свойства системы. Такие исследования становятся возможными благодаря чувствительности константы ядерного сверхтонкого расщепления и g -фактора к ориентации радикала относительно поля. Как уже обсуждалось, расстояние между ЭПР-линиями и резонансное значение внешнего поля определяются константой расщепления и g -фактором. Дополнительное влияние оказывает полярный характер нитроксильной связи, который приводит к расщеплению линий и к зависимости g -фактора от полярности окружения. Зависимость параметров спектра ЭПР от ориентации метки и полярности ее окружения позволяет получить информацию о структуре участка молекулы, к которому присоединена спиновая метка. Поскольку анизотропное сверхтонкое расщепление и g -фактор чувствительны к молекулярному движению, исследования с применением спиновой метки позволяют получить информацию и о динамических свойствах системы.

Метод спиновой метки нашел применение в решении многих проблем (см. Berliner, 1976, 1978). Среди наиболее плодотворных его применений находится исследование структурно-функциональных взаимосвязей в фосфолипидных бислоях (более подробно об этом см. гл. 25).

Краткие выводы

Спектроскопия магнитного резонанса является весьма эффективным подходом при решении задач биофизической химии. Вращающийся вокруг собственной оси заряд, такой, как ядро (например, протон) или неспаренный электрон, во внешнем магнитном поле прецессирует вокруг направления поля (ось z) с характерной частотой, которая пропорциональна величине внешнего поля. z -Составляющая магнитного момента, порожденного вращающимся зарядом, может принимать лишь дискретные значения, и при переходах между соседними квантовыми уровнями происходит резонансное поглощение электромагнитной энергии. Резонанс достигается путем изменения внешнего поля до тех пор, пока частота прецессии не совпадет с частотой переменного поля.

Среди других факторов, влияющих на параметры спектров ядерного магнитного резонанса (ЯМР), важную роль играют времена продольной (T_1) и поперечной (T_2) релаксаций. Эти величины чувствительны к окружению молекулы и к ее движению и, следовательно, могут быть использованы для получения информации о структуре и динамических свойствах системы.

Характерная частота прецессии ядра в значительной мере зависит от локального окружения, и поэтому однотипным ядрам в составе одной молекулы могут соответствовать разные по положению сигналы. Кроме того, из-за наличия между соседними ядрами спин-спинового взаимодействия линия резонансного поглощения данного ядра может расщепиться на две или более линии. Зная величину расщепления, в некоторых случаях находят двугранные углы внутреннего вращения.

Наиболее распространенным объектом исследования в спектроскопии ЯМР являются протоны. Это связано с их высоким содержанием в различных соединениях и достаточно высокой чувствительностью. Спектры протонного магнитного резонанса биополимеров из-за наличия в последних большого числа атомов водорода обычно оказываются весьма сложными. Тем не менее, проявив известную изобретательность, эти спектры иногда удается расшифровать и получить подробную информацию о том или ином участке биологической макромолекулы. Иногда более удобным оказывается ЯМР на ядрах ^{13}C , в частности, из-за лучшего спектрального разрешения по сравнению с протонным резонансом, а также благодаря меньшим трудностям при расшифровке спектров. В других случаях для изучения структурно-функциональных особенностей какого-либо центра применяют зонд ^{19}F , способный к специфическому связыванию.

Теория электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) в принципе аналогична теории ЯМР. Дополнительными величинами здесь являются ядерное сверхтонкое взаимодействие и g -фактор. Сверхтонкое взаимодействие неспаренного электрона с ядром, обладающим спином I , приводит к расщеплению каждой линии в спектре ЭПР на $2I + 1$ линию. Это значит, что, например, неспаренному электрону, локализованному у атома азота ($I = 1$), соответствует спектр, состоящий из трех линий. Как сверхтонкое расщепление, так и g -фактор оказываются чувствительными к ориентации радикала во внешнем поле, к молекулярному движению и полярности локального окружения. Эти факторы в свою очередь влияют на характеристики сигналов ЭПР, что позволяет исследовать структуру, динамические свойства и полярность системы.

Многие биологические системы не содержат групп с неспаренными электронами. Чтобы исследовать такие системы методом ЭПР, в них вводят специфически связывающийся зонд, который содержит радикал. Наиболее распространенными зондами, или спиновыми метками, являются производные нитроксильного радикала. При введении их в биологическую систему необходимо соблюдать определенную осторожность и убедиться в том, что свойства системы существенно не меняются. При удачном включении такой метки она может служить весьма чувствительной репортерской группой.

Задачи

9.1. Выведите уравнения Блоха [уравнение (9.25)] из непосредственно предшествующих им соотношений.

9.2. Используя условия стационарности [уравнение (9.28)], выведите уравнение (9.29).

9.3. Предположим, что белок содержит четыре гистидиновых остатка. Когда белок находится в нативном состоянии, ЯМР-сигналы, отвечающие C-2-протонам этих четырех остатков в спектре, полученном при частоте 220 МГц, оказываются разрешенными. Эти сигналы находятся в интервале от 8 до 9 м.д. по отношению к стандартному сигналу ТМС. В присутствии достаточного количества реагента X (например, мочевины) белок денатурирует; при этом наблюдается только один пик (при 8,4 м.д.), площадь которого равна сумме площадей исходных пиков нативной формы. Раствор нативного белка титруют реагентом X. При низких концентрациях X четыре ЯМР-линии, отвечающие остаткам гистидина, расщепляются на восемь линий, причем четыре из них остаются в том же месте, что и в спектре нативного белка, а четыре другие смещаются примерно на 0,1 м.д. По мере добавления реагента X четыре «нативные» линии исчезают, а амплитуда четырех новых линий возрастает. Наконец, при достаточно высоких концентрациях X они сливаются в один пик при 8,4 м.д.

Объясните эти данные, руководствуясь представлениями о разворачивании белковой цепи. Какую информацию о скоростях отдельных стадий разворачивания можно извлечь из этих данных?

9.4. При присоединении лиганда L к белку спектр ЯМР последнего, полученный при частоте 100 МГц, изменяется. Наибольшим изменениям подвергается спектр протонного резонанса в области от -80 до -160 Гц (относительно стандартного сигнала ДСС). Используя аффинную метку L' — аналог лиганда, ковалентно связывающийся с белком, — можно показать, что центром связывания в белке является остаток тирозина.

Согласуется ли результат эксперимента с использованием аффинной метки с данными ЯМР? Объясните ваш ответ. Если бы у вас была возможность снять для проверки правильности вашего ответа еще один спектр ЯМР, какой образец вы бы выбрали? Почему?

9.5. Предположим, что имеется неспаренный электрон, взаимодействующий с тремя эквивалентными протонами. Опишите в общих чертах спиновые переходы в этой системе. Сколько линий будет наблюдаться в спектре ЭПР? Докажите утверждение, высказанное в тексте, о том, что число линий для электрона, взаимодействующего с n эквивалентными ядрами со спином I , равно $2nI + 1$.

ЛИТЕРАТУРА

Общая

- Abragam A.*, 1961. The Principles of Nuclear Magnetism, London, Oxford Univ. Press.
- Carrington A., McLachlan A.D.*, 1979. Introduction to Magnetic Resonance, New York, Halsted Press.
- Fehér G.*, 1970. Electron Paramagnetic Resonance with Applications to Selected Problems in Biology (Les Houches Lectures, 1969), New York, Gordon and Breach.
- James T.L.*, 1975. Nuclear Magnetic Resonance in Biochemistry, New York, Academic Press. [Широкое освещение принципов метода ЯМР и его применения в биологических исследованиях.]
- Lynden-Bell R.M., Harris R.K.*, 1969. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, London, Thomas Nelson. [Вводный курс.]
- Pople J.A., Schneider W.G., Bernstein H.J.*, 1959. High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance, New York, McGraw-Hill. [Классическое описание метода ЯМР.]
- Roberts J.D.*, 1959. Nuclear Magnetic Resonance, New York, McGraw-Hill. [Популярный вводный курс, в котором акцент сделан на применении ЯМР в органической химии. Хотя этот курс опубликован в 1959 г., он сохраняет свою ценность благодаря изложению в нем основных принципов метода.]
- Slichter C.P.*, 1963. Principles of Magnetic Resonance, New York, Harper and Row.
- Swartz H.M., Bolton J.R., Borg D.C., eds.*, 1972. Biological Applications of Electron Spin Resonance, New York, Wiley-Interscience. [Гл. 1, написанная Болтоном, представляет собой введение в теорию ЭПР. В гл. 2, написанной Смитом, излагается метод спиновой метки. В других главах освещаются различные приложения этого метода.]
- Wertz J.E., Bolton J.R.*, 1972. Electron Spin Resonance: Elementary Theory and Applications, New York, McGraw-Hill. [Хорошее введение в основы ЭПР.]

Специальная

- Berliner L.J., ed.*, 1976. Spin Labeling, New York, Academic Press.
- Berliner L.J., ed.*, 1978. Spin Labeling II, New York, Academic Press.
- Bowden F.L.*, 1975. In: Techniques and Topics in Bio-Inorganic Chemistry, ed. C.A. McAuliffe, New York, Wiley, p.205.
- Dwek R.A.*, 1973. Nuclear Magnetic Resonance in Biochemistry: Applications to Enzyme Chemistry, Oxford, Clarendon Press.
- Hunkapillar M.W., Smallcombe S.H., Whitaker D.R., Richards J.H.*, 1972. Carbon nuclear magnetic resonance studies of the histidine residue in α -lytic protease: Implications for the catalytic mechanism of serine proteases, *Biochemistry*, **12**, 4732.
- Karplus M.*, 1959. Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments, *J. Chem. Phys.*, **30**, 11.
- Karplus M.*, 1963. Vicinal proton coupling in nuclear magnetic resonance, *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 2870.
- Levy G., ed.*, 1976. Topics in Carbon-13 NMR Spectroscopy, vol. 2, New York, Wiley.
- McConnell H.M.*, 1971. Spin-label studies of cooperative oxygen binding to hemoglobin, *Ann. Rev. Biochem.*, **40**, 227.
- Moon R.B., Richards J.H.*, 1973. Determination of intracellular pH by ^{31}P magnetic resonance, *J. Biol. Chem.*, **248**, 7276.
- Roberts G.C.K., Jardeky O.*, 1970. Nuclear magnetic resonance spectroscopy of amino acids, peptides and proteins, *Adv. Protein Chem.*, **24**, 447.
- Sykes B.D., Scott M.D.*, 1972. Nuclear magnetic resonance studies of the dynamic aspects of molecular structure and interaction in biological systems, *Ann. Rev. Biophys. Bioengin.*, **1**, 27.
- Ugurbil K., Norton R.S., Allerand A., Bersohn R.*, 1977. Studies of individual carbon sites of azurin from *Pseudomonas aeruginosa* by natural-abundance carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Biochemistry*, **16**, 886.
- Ugurbil K., Rottenberg H., GLynn P., Shulman R.G.*, 1978. ^{31}P nuclear resonance studies of bioenergetics and glycolysis in anaerobic *Escherichia coli* cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2244.

10.1. Методы прямого наблюдения

Насколько велика молекула и как она выглядит? Эти вопросы возникают сразу, когда речь заходит о любой биологической молекуле. Существует множество методов, позволяющих ответить на эти вопросы. Однако получаемая с их помощью информация различна как по степени надежности, так и по степени разрешения структуры макромолекулы. Начнем наше обсуждение с методов, наиболее близких к оптическим методам прямого наблюдения больших объектов.

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ МОЛЕКУЛ

В методах, дающих наиболее полные сведения о размерах и форме макромолекул, необходимо применение образцов в твердом состоянии. Наиболее простым является метод прямого наблюдения макромолекул в электронном микроскопе. Современные электронные микроскопы обеспечивают разрешение до $2 - 4 \text{ \AA}$; этого вполне достаточно для наблюдения многих важных структурных особенностей при условии, что достигнут соответствующий контраст между образцом и поддерживающей его пленкой-подложкой. Рассеяние электронов пропорционально квадрату атомного номера рассеивающего атома. Так, рассеивающая способность урана в 10^4 раз больше, чем рассеивающая способность водорода.

Биополимеры и соответствующие пленки-подложки состоят в основном из легких атомов. Поэтому контраст для прямого наблюдения фактически любого биополимера оказывается недостаточным, за исключением таких макромолекул, как, например, ферритин, имеющий в центральной части группу Fe_2O_3 . Почти всегда для наблюдения образца приходится прибегать к различным способам его обработки, что приводит к существенной потере в разрешении.

Позитивное контрастирование заключается во введении тяжелых атомов в образец. Это можно сделать с помощью специфического химического комплекса (например, связывания ионов уранила с ДНК или фиксации осмием липидных бислоев). Но чаще всего применяют способ оттенения. С раскаленной проволоки, которая служит источником тяжелых атомов, вольфрама (или другой тяжелый металл) напыляют на образец. Тяжелые атомы осаждаются на поверхности как образца, так и пленки-подложки, которые расположены на поддерживающей их сетке. Если напыление ведется под фиксированным углом, атомы металла накапливаются перед образцом, тогда как непосредственно за исследуемым объектом, там, куда на пленку-подложку не попадают атомы металла, образуется тень (рис. 10.1, А). Размер тени определяется высотой образца. Иногда образец вращают и при этом напыляют металл под малым углом. В этом случае тень не образуется, но избыток металла скапливается вблизи характерных вертикальных поверхностей структур, что и позволяет выявлять их при наблюдении.

Вторым способом является негативное контрастирование. В данном случае образец помещается в контрастирующий раствор, содержащий тяжелые атомы, например в раствор уранилацетата. Рассеивающие тяжелые атомы заполняют все пространство вокруг нерассеивающей макромолекулы, и поэтому на их фоне становится возможным наблюдение макромолекулы в электронном микроскопе (рис. 10.1, Б). К сожалению, это наблюдение нельзя назвать прямым, так как реально получают изображение не самой макромолекулы, а всей той рассеивающей области, где ее нет.

Перечисленные способы имеют свои недостатки. Для наблюдения в электронном микроскопе исследуемый образец должен быть высушен и помещен в высокий вакуум. В про-

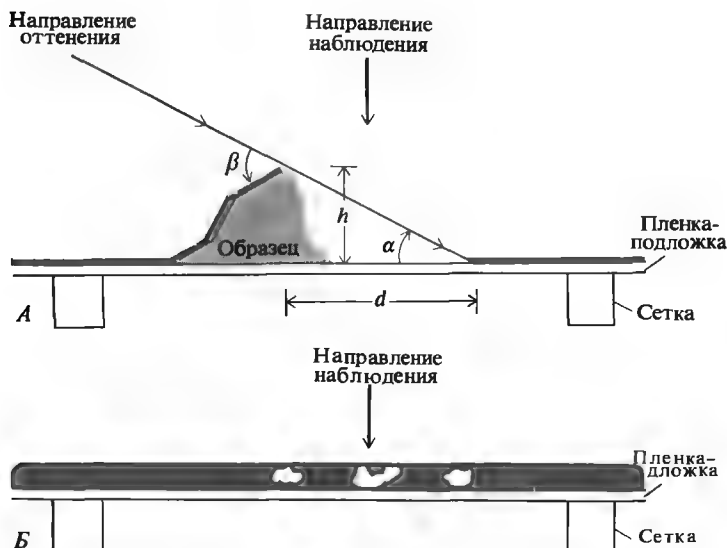


РИС. 10.1. Схема обработки образцов для электронной микроскопии. Коричневым цветом показан слой тяжелых атомов. А. Обработка образца по методу оттенения. Б. Негативное контрастирование. d — длина тени, α — угол оттенения, $h = d \cdot \operatorname{tg} \alpha$ — высота объекта; толщина слоя металла пропорциональна $\sin \beta$.

цессе химического окрашивания тяжелыми атомами, процедуры довольно грубой, возникает большая опасность нарушения структуры образца. Белки и нуклеиновые кислоты при физиологических условиях содержат значительное количество связанной воды. Как обсуждалось ранее, структура макромолекулы в значительной степени определяется силами, зависящими от присутствия воды. Ясно, что в условиях высокого вакуума электронного микроскопа гидрофобные силы и гидратация должны сильно изменяться. Часто для сохранения структуры макромолекулы в состоянии, близком к тому, в котором она находится в водном растворе, применяют такие фиксирующие агенты, как глутаральдегид, образующий поперечные сшивки. К сожалению, даже в этом случае возможность нарушения структуры образца не исключена. К тому же образец может сильно разрушаться под действием пучка электронов.

Для выявления возможных артефактов электронной микроскопии весьма полезно непосредственное сравнение структуры макромолекулы в водном растворе с данными электронной микроскопии. К сожалению, это далеко не всегда реально, поскольку большинство молекул, структура которых подробно изучена, слишком малы для точных исследований в электронном микроскопе, тогда как макромолекулы, структура которых детально охарактеризована с помощью электронного микроскопа, часто являются настолько большими, что непригодны для изучения методами исследования в растворах, во всяком случае для них нельзя получать этими методами столь же подробные сведения об их строении. Сопоставление структур возможно для вирусов и некоторых больших регулярных образований, таких, как микротрубочки и мышечные волокна. Как правило, наблюдается хорошее качественное совпадение, что же касается количественных данных, то они совпадают лишь в случае определения размеров или способа упаковки субъединиц.

В настоящее время предпринимаются значительные усилия для усовершенствования методов электронной микроскопии. Например, в сканирующем электронном микроскопе

высокого разрешения, разработанном Крю, можно различать упругое и неупругое рассеяние электронов, благодаря чему достигается гораздо больший контраст и появляется возможность наблюдать отдельные тяжелые атомы. По мере усовершенствования метода, очевидно, станет доступным увеличение контраста и для более легких атомов.

УМЕНЬШЕНИЕ ВЕРОЯТНОСТИ ПОЯВЛЕНИЯ АРТЕФАКТОВ, СВЯЗАННЫХ С ВЫСУШИВАНИЕМ И УСАДКОЙ В ПРОЦЕССЕ ПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Для исследования образцов, из которых растворитель полностью не удаляется, был разработан ряд оригинальных методов. Одним из них является метод замораживания—травления. Замороженный образец раскалывают ударом ножа и затем лиофилизируют. При этом растворитель сублимирует, нелетучие макромолекулы выступают из замороженного водного слоя, и в результате на поверхности выявляется тонкая структура образца. Затем с помощью специального источника на исследуемую поверхность напыляют атомы углерода, благодаря чему создается тонкая углеродная пленка, являющаяся репликой поверхности. Углеродную реплику осторожно отделяют от поверхности и помещают на сетку электронного микроскопа. После оттенения тяжелыми атомами реплику исследуют обычным способом в микроскопе. Внешний вид образцов, приготовленных методом замораживания—травления или сходным методом, часто значительно отличается от вида образцов, приготовленных простым высушиванием на воздухе фиксированных образцов. Например, рибосомы 70S, приготовленные методом замораживания—травления, имеют размеры $170 \times 230 \times 250 \text{ \AA}$ и соответственно объем $5,1 \cdot 10^6 \text{ \AA}^3$. Более распространенный метод простого высушивания обычно дает размеры $160 \times 180 \times 200 \text{ \AA}$ и соответственно меньший объем $3,0 \cdot 10^6 \text{ \AA}^3$. Данная ситуация напоминает случай уменьшения объема при превращении сливы в чернослив, причем оценить такое уменьшение довольно трудно.

Уменьшение объема образца происходит из-за коллапса его структуры в результате удаления воды. Основной причиной этого служит поверхностное натяжение воды, связанной с образцом. При высушивании остающаяся связанная с образцом вода сжимает его, так чтобы поверхность жидкости оставалась минимальной. Лиофильное высушивание замороженного образца позволяет исключить его усадку. В данном случае образец заморожен, и вода удаляется возгонкой. Однако сам процесс замораживания может вести к структурным нарушениям, вызываемым образованием кристаллов льда.

Другим способом подготовки образца является высушивание его при температуре и давлении, соответствующих критической точке для данной жидкости. В этих условиях наблюдается переход из одной фазы в другую, здесь не происходит изменений объемов этих фаз, а поверхностное натяжение жидкости становится равным нулю. Следовательно, жидкую фазу можно удалить из образца без уменьшения его объема. К сожалению, критическая температура для воды равна 374°C . Поэтому первое, что необходимо сделать, это заменить воду образца (до высушивания его) на жидкость, имеющую более низкую критическую температуру. Один из способов понижения критической температуры заключается в переводе образца из водной среды последовательно в этанол, амилацетат, а затем в жидкую двуокись углерода (ее критическая температура равна $36,5^\circ\text{C}$). Такой способ, безусловно, таит в себе опасность возникновения артефактов, обусловленных контактом образца с органическими растворителями. Судя по всему, лучший способ исключить артефакты — это готовить один и тот же образец различными методами, принимая за достоверные те детали структуры, которые наблюдаются в электронном микроскопе в образцах, приготовленных всеми способами (рис. 10.2, 10.3).

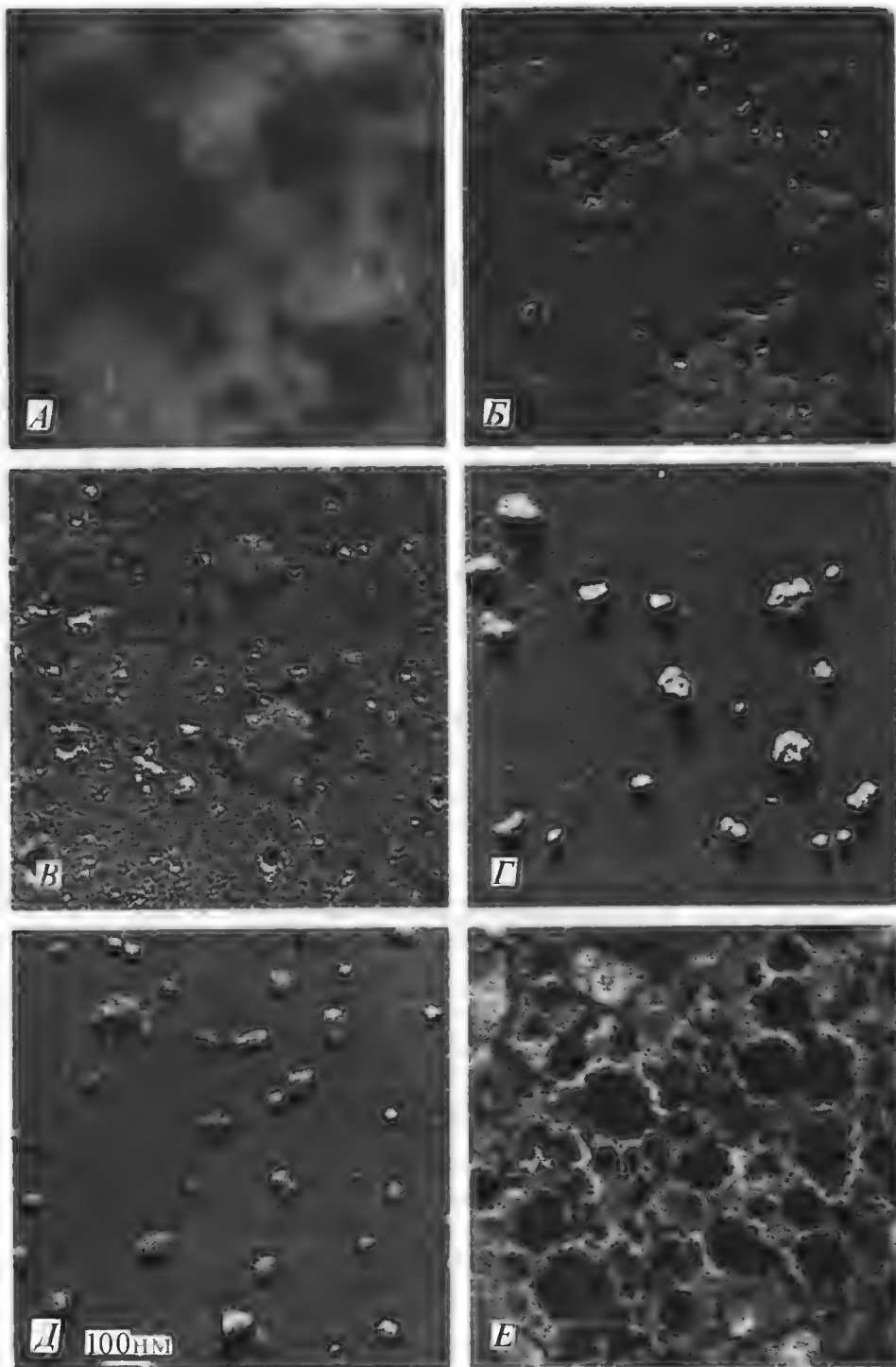


РИС. 10.2. Изображение образцов гликогена печени в зависимости от способа их обработки для электронной микроскопии. *А.* Негативное контрастирование. *Б.* Образец высушен на воздухе и затем оттенен. *В.* Образец высушен фильтрацией через агар и затем оттенен. *Г.* Образец заморожен, лиофильно высушен и затем оттенен. *Д.* Замороженный образец лиофильно высушен, перед оттенением выдержан в водных парах. *Е.* Гликоген в тонком срезе ткани печени. (Микрофотографии любезно предоставлены Келленбергером, Виллигером и Кистлером.)

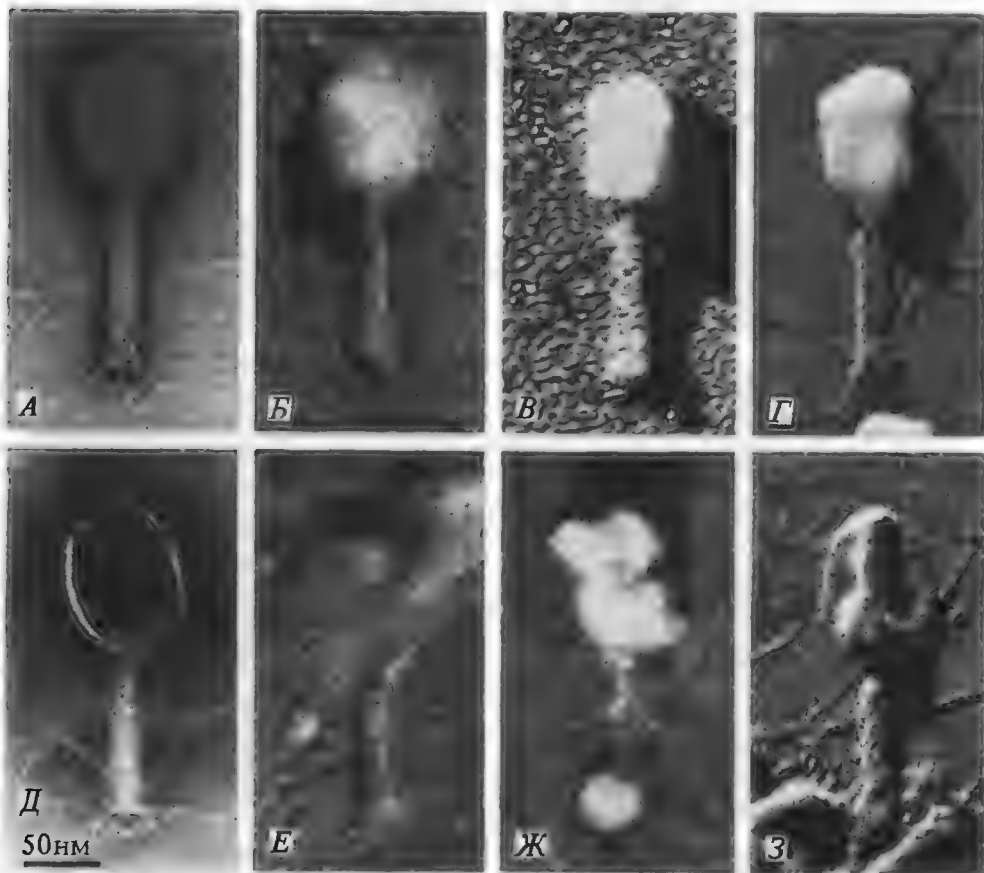


РИС. 10.3. Изображение бактериофага Т4 в зависимости от способа обработки образца для электронной микроскопии. От Д до З — изображения оболочек бактериофагов, из которых удалена ДНК. А, Д. Негативное контрастирование. Б, Е. Образцы высушены на воздухе и затем оттены. В, Ж. Образцы высушены в замораживании и оттены микрокапельным методом (обратите внимание на разрушение оболочки в Ж). Г, З. Замороженный образец высушен, оттнен преддсорбционным методом (отметьте лучшее изображение нитей отростка по сравнению с другими оттненными образцами). (Микрофотографии любезно предоставлены Кистлером, Тен-Хегелером и Келленбергером.)

● ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИММЕТРИИ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИЗОБРАЖЕНИЯ

Разрешение и четкость электронной микрофотографии часто могут быть улучшены методом усреднения. Предположим, объект исследования, например базальная пластинка бактериофага Т4 (рис. 10.4, А), обладает простой симметрией вращения. Тогда наложение повернутых относительно друг друга микрофотографий должно исключить беспорядочный шум и сделать изображение более четким.

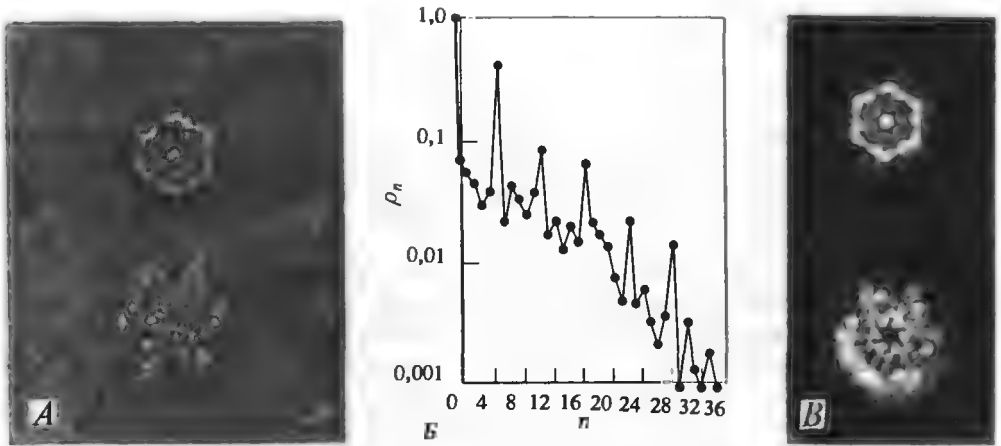


РИС. 10.4. Электронная микроскопия базальной пластинки бактериофага Т4. Вверху показана растянутая базальная пластинка (диаметр $\sim 500 \text{ \AA}$), ниже — пластинка в сокращенном состоянии (диаметр $\sim 550 \text{ \AA}$). [Crowther et al., J.Mol. Biol., 116, 489 (1977).] А. Исходная микрофотография. Б. Вращательный спектр мощности изображения растянутой базальной пластинки. В. Изображение после фильтрации (ось симметрии 6-го порядка).

Более строгим и точным способом является математическая фильтрация изображений. При этом электронно-микроскопический снимок разбивается на множество участков, плотность изображений в которых представлена числами в полярных координатах $\rho(r, \phi)$. Эта плотность затем представляется в виде ряда по цилиндрическим функциям (примеры см. в Дополнении 13.2):

$$\rho(r, \phi) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} g_n(r) e^{in\phi}, \quad \text{где} \quad g_n(r) = \int_0^{2\pi} \rho(r, \phi) e^{-in\phi} d\phi \quad (10.1)$$

где функция $g_n(r)$ описывает плотность изображения на расстоянии r для образца, имеющего n -кратную симметрию вращения. Поскольку $\rho(r, \phi)$ — вещественная величина, отсюда следует, что $g_{-n}(r) = g_n^*(r)$, где звездочка в индексе обозначает комплексно-сопряженное значение. Таким образом, выражение (10.1) может быть представлено как

$$\rho(r, \phi) = g_0(r) + 2 \sum_{n=1}^{\infty} g_n(r) \cos n\phi \quad (10.2)$$

в соответствии с соотношениями между экспоненциальными и тригонометрическими функциями, описанными в Дополнении 13.1.

Суммарная составляющая n -кратной симметрии изображения может быть получена интегрированием функции плотности от центра изображения ($r = 0$) до радиуса a . Соответствующий интеграл называется мощностью ρ_n

$$\rho_n = \epsilon_n \int_0^a |g_n(r)|^2 r dr \quad \text{для} \quad n = 0, 1, \dots, \infty \quad (10.3)$$

Величина ϵ_0 равна единице, но остальные ϵ_n равны двум, потому что g_{-n} и g_n вносят равный вклад в мощность. Зависимость ρ_n от n дает вращательный спектр мощности (рис. 10.4, Б). Для рассматриваемого объекта (базальная пластинка фага Т4) спектр мощности имеет четкие максимумы для n , кратных 6. Таким образом, отфильтрованное изображение может быть получено восстановлением $\rho'(r, \phi)$, включающим только члены, соот-

ветствующие максимумам

$$\rho'(r, \phi) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} g_{on}(r) e^{i6n\phi} \quad (10.4)$$

Если мы сравним рис. 10.4, *Б* с исходным изображением рис. 10.4, *А*, то увидим, что описанная процедура привела к резкому увеличению четкости изображения.

Для улучшения качества изображения образцов, имеющих более выраженную симметрию, подобных кристаллитам или спиральным молекулам, обычно применяют метод фурье-преобразования (гл. 13). В том случае, если симметрия проявляется на большей части изображения, более удобным способом улучшения качества изображения по сравнению с численным методом является фурье-фильтрация изображения с применением оптической дифракции (рис. 10.5, *А*). Фотография электронно-микроскопического изображения используется как решетка для получения дифракционной картины, которая может быть вновь преобразована в изображение. Если исходное изображение обладает двумерной трансляционной периодичностью, то дифракционная картина представляет собой регулярную систему рефлексов (рис. 10.5, *В*). В этом случае перед дифракционной картиной

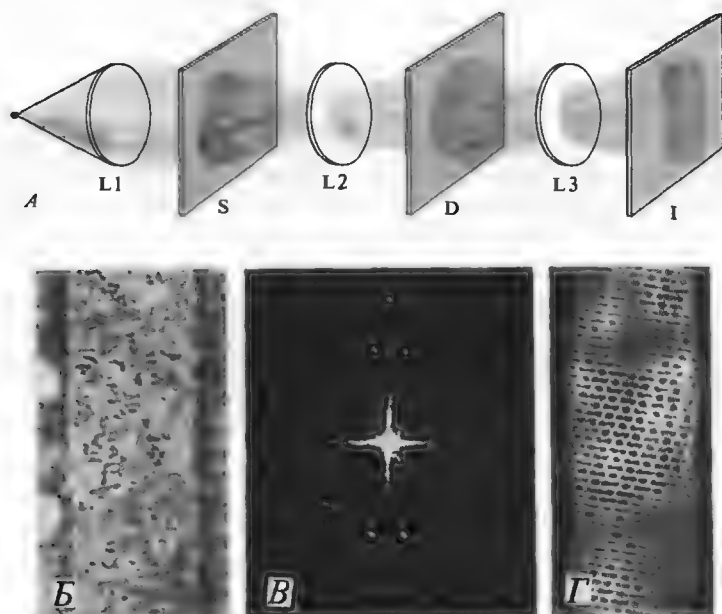


РИС. 10.5. Оптическая фильтрация электронно-микроскопической фотографии. *А*. Схема оптической системы фурье-фильтрации электронно-микроскопического изображения. Свет от точечного источника проходит через линзы (*L1*, *L2*, *L3*), электронно-микроскопическую фотографию (*S*) и фокусируется в дифракционной плоскости *D*, образованной изображением *S*, действующим как дифракционная решетка. Световой пучок, прошедший через дифракционную плоскость *D*, вновь фокусируется в плоскости *I*, образуя отфильтрованное изображение. Часто между *D* и *L3* помещают маски, чтобы отсечь нежелательные части изображения. *Б*. Исходное электронно-микроскопическое изображение. *В*. Дифракционная картина изображения *Б*. *Г*. Отфильтрованное изображение *Б*. Объект исследования — «полиголовики» бактериофага Т4; такая гигантская головка возникает при нарушении сборки фага. Расстояние между центрами гексагональных колец субъединиц в отфильтрованном изображении приблизительно 100 Å. [Электронные микрофотографии взяты из работы Crowther, Klug, Ann. Rev. Biochem., 44, 161 (1975).]

помещают маску, пропускающую рефлексы, которые затем фокусируются, тогда как аperiodический шум исходного изображения при этом отсекается. Иногда удается дополнительно улучшить изображение. На рис. 10.5, Б приведена фотография головок бактериофага Т4. Эти трубчатые структуры при высушивании на сетке образуют плоский двойной слой, так что снимок получается в результате наложения изображений верхнего и нижнего слоев образца. Такой образец дает дифракционную картину от этих двух периодических решеток, связанных зеркально-поворотной симметрией. Если использовать маску, которая пропускает дифракционную картину только от одной решетки, то при рефокусировке получается очень четкое изображение только одного слоя (рис. 10.5, Г).

Ясно, что данные электронной микроскопии привлекают не только своим изяществом, они являются также весьма многообещающими в научном плане. Если удастся добиться резкого увеличения контраста изображения, то это приведет к огромному расширению возможностей метода электронной микроскопии. Даже на данном этапе этот метод является исключительно ценным при изучении очень больших молекул, таких, как ДНК. Некоторые примеры применения электронной микроскопии будут обсуждаться в последующих главах.

РАДИОАВТОГРАФИЯ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

Если радиоактивный образец поместить на фотозмульсию, обладающую соответствующими свойствами, то высокоэнергетические частицы, испускаемые при радиоактивном распаде, будут воздействовать на фотозмульсию. Свойства ядерных фотозмульсий таковы, что каждая частица вызывает образование только одного или нескольких зерен серебра. Таким образом, после определенного времени контакта с радиоактивным образцом и последующего проявления расположение зерен серебра фотозмульсии будет соответствовать форме радиоактивной молекулы. Типичный пример радиоавтограммы ДНК приведен на рис. 10.6.

Привлекательность этого простого метода заключается в том, что при его применении не происходит существенных нарушений структуры молекулы. Однако и он имеет два больших недостатка. Они обусловлены, во-первых, конечным размером зерен серебра и, что более существенно, значительной длиной пробега частиц. Последнее обстоятельство является причиной того, что разрешение ухудшается до сотен ангстрем для ^3H , тысяч ангстрем для ^{14}C и еще большей величины для ^{32}P . Второй недостаток заключается в следующем: в получения изображения образца необходимо, чтобы произошло несколько распадов на молекулу. Так что, если исследователь не обладает исключительным терпением, он должен применять короткоживущие изотопы. При этом еще более серьезной проблемой является то, что радиоактивными изотопами должна быть замещена существенная часть атомов молекулы.

Предположим, изучают ДНК такого размера, как ДНК *E. coli* (мол. масса $2 \cdot 10^9$). Ее контур четко определит тысяча точек распада, равномерно распределенных по длине молекулы. Если используют ^{32}P , время полураспада которого равно 14 дням, и если экспозиция длится 14 дней, то в молекулу ДНК должно быть включено 2000 атомов ^{32}P . Это соответствует удельной радиоактивности $2,5 \text{ Ки} \cdot (\text{ммоль Р})^{-1}$ ($1 \text{ Ки} = 2,2 \cdot 10^{12} \text{ расп./мин}$). Это достаточно высокая плотность излучения. Для приготовления образца культуры *E. coli* выращивают в среде с ^{32}P . При этом возникает опасность радиационных нарушений не только в растущей клетке, но и в самой ДНК, в которой могут появиться разрывы. Радиоавтография молекул высших организмов еще более затруднена из-за большей чувствительности к радиации.

Несмотря на эти трудности, радиоавтография является мощным дополнительным методом исследования ДНК. Она успешно применяется при импульсной метке, когда наблюдается предпочтительное включение ^{32}P в новосинтезированные области. Таким спо-



РИС. 10.6. Радиоавтограмма реплицирующейся молекулы ДНК *E. coli*. Около 10% исходной кольцевой двухцепочечной молекулы реплицировалось с образованием двух дочерних дуплексов, благодаря чему и появилась дополнительная петля вверху справа. Длина молекулы от начала до конца 0,65 мм. (С любезного разрешения д-ра Кэрнса.)

собом можно специфически исследовать структуру областей, участвующих в репликации. Белки не столь удобный объект для радиоавтографических исследований, как нуклеиновые кислоты, поскольку их атомы нельзя легко заменить короткоживущими изотопами.

ДИФРАКЦИЯ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ

Дифракция рентгеновских лучей, являющаяся важным методом исследования макромолекул, подробно рассматривается отдельно в гл. 13 и 14. Здесь же мы обсудим в общих чертах лишь некоторые результаты исследований дифракции на монокристаллах. Рентгеноструктурный анализ позволяет получить трехмерную картину регулярного распределения электронной плотности в кристаллической решетке. Как правило, некоторую информацию о размере и форме макромолекулы можно получить из симметрии кристалла, его плотности и размера основного повторяющегося элемента (элементарной ячейки). Во многих случаях получают также данные о числе субъединиц и симметрии их взаимного расположения.

Разрешение на карте электронной плотности зависит от качества кристалла и совокупности накопленных данных. В свою очередь уровень информации о деталях структуры кристалла определяется разрешением карты электронной плотности. При разрешении 10 Å обычно бывает трудно заключить, где же одна молекула в кристалле кончается, а другая начинается. Это понятно, так как обычно небольшие белки имеют диаметр всего 30 Å, а тесный контакт между макромолекулами в макромолекулярном кристалле не является чем-то необычным. Пространственное распределение электронной плотности отдельной молекулы белка или нуклеиновой кислоты можно определить при разрешении 6 Å. Это разрешение позволяет получить общее представление о форме макромолекулы и таких характерных особенностях, как наличие в ней углублений и карманов. Данные рентгеноструктурного анализа с таким разрешением сравнимы с лучшими результатами, полученными с помощью фурье-преобразования изображения кристаллического образца в электронном микроскопе.

Карта электронной плотности с разрешением, равным 4 Å или еще лучшим, дает такие подробные сведения о структуре молекулы, которые нельзя получить ни одним другим методом и даже несколькими методами в совокупности (исключая, конечно, такие близкие методы, как дифракция электронов и нейтронов). При разрешении от 3 до 4 Å можно определять состав, длину и ориентацию участков вторичной структуры. Если известна первичная структура, то при сопоставлении ее с картой электронной плотности можно оценить пространственное расположение каждого отдельного атома структуры. При разрешении 2 Å карта электронной плотности настолько подробна, что большая часть первичной структуры следует прямо из данных рентгеноструктурного анализа.

Учитывая трудоемкость рентгеноструктурного анализа и необходимость наличия объекта обязательно в виде кристалла, приходится признать, что этот метод имеет смысл применять лишь для образцов, представляющих особый интерес, которые к тому же должны достаточно легко кристаллизоваться. Рентгеноструктурный анализ — самый информативный из методов исследования структуры макромолекул. Он может рассматриваться как эталон, и с его результатами полезно сравнивать результаты, полученные другими методами. Рентгеноструктурный анализ не является непогрешимым методом, и он не может дать ответ на все интересующие нас вопросы о каком-нибудь белке или нуклеиновой кислоте, но других методов, способных дать столь подробные сведения о структуре, пока не существует.

10.2. Гидродинамические методы исследования макромолекул

Размер и форма макромолекулы влияют на характер ее движения в растворе. Само присутствие молекулы в растворе изменяет физические свойства жидкости. В ряде методов этот факт используется для оценки молекулярной массы и формы молекулы. Поскольку экспериментальные данные, получаемые с помощью этих методов, содержат мало сведений об особенностях формы макромолекулы, необходимо строить физически правдоподобные модели молекул, которые удовлетворяли бы экспериментальным данным. Следует отметить, что для измерений в изотропном растворе характерна нечувствительность к молекулярной асимметрии, а разрешение гидродинамических методов не позволяет выявлять сложные формы или структурные особенности молекул. В определении свойств жидкости важную роль играет взаимодействие макромолекулы с различными низкомолекулярными веществами. Мы мало знаем о подобных взаимодействиях, и это, несомненно, ограничивает полноту и точность получаемых данных о действительной структуре макромолекул.

ОБЗОР МЕТОДОВ

Рассматриваемые методы можно разбить на несколько групп. В основе одних методов лежит изучение поступательного движения. Причиной диффузии в отсутствие внешней силы является броуновское движение. Диффузию вещества определяют, измеряя поток макромолекул или флуктуацию их числа в малом объеме. Для создания дополнительного поступательного движения могут быть приложены внешние поля. Такими полями являются гравитационное поле в случае простой седиментации, электрическое поле при электрофорезе, а также центробежное ускорение при скоростной седиментации в ультрацентрифуге.

Другие методы основаны на изучении вращательного движения. Вращательное броуновское движение в отсутствие внешних полей можно исследовать методом поляризованной флуоресценции. Спектры ЯМР и ЭПР также, как правило, содержат информацию о вращательном движении. В данном случае внешнее магнитное поле не оказывает значительного влияния на движение молекул. При ориентации в потоке или электрическом поле нормальное изотропное распределение макромолекул в растворе может изменяться. Вращательное движение, восстанавливающее исходную ориентацию, исследуется с помощью различных методов, в том числе двойного лучепреломления и дихроизма. Вязкость является характеристикой суммарных свойств раствора. Она в значительной степени определяется как вращательным, так и поступательным движением больших молекул растворенного вещества.

Методы, рассматривающие флуктуации положения или ориентации молекул, объединяют в третью группу. Эта группа методов основана на сопоставлении различных рас-

пределений макромолекул (или фрагментов макромолекул) в окружающем их растворителе. Светорассеяние, рассеяние рентгеновских лучей, а также рассеяние нейтронов в основе своей сходные методы. Но информация, получаемая каждым из них, различается по своему характеру, так как измерения проводятся при разных длинах волн излучения или при облучении разными частицами и, следовательно, законы рассеяния падающего пучка на объект для них различаются.

ОБЪЕМ И ГИДРАТАЦИЯ МАКРОМОЛЕКУЛ

Молекулярный объем V отдельной молекулы может быть определен, если известны молекулярная масса M и удельный объем чистого вещества $\bar{V}^\Delta$:

$$V = M \bar{V}^\Delta / N_0 \quad (10.5)$$

где N_0 — число Авогадро. Удельный объем чистого вещества является величиной, обратной плотности, и имеет размерность $\text{см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$.

Способы определения $\bar{V}^\Delta$ известны с древнейших времен. Обычно измеряется вес образца, а объем определяется погружением его в жидкость, не взаимодействующую с ним. Объем вытесненной жидкости равен объему образца. К сожалению, молекулу белка или нуклеиновой кислоты нельзя представить себе в чистом виде по двум причинам. Во-первых, эти молекулы являются полиэлектролитами, и для нейтрализации зарядов этих молекул необходимы противоионы. Второй еще более серьезной причиной является возможность сильного связывания между молекулами обычного растворителя (такого, например, как вода) и биополимерами. Фактически объектом исследований в водном растворе является гидратированная молекула, несущая противоионы.

Обычно большинство белков и нуклеиновых кислот растворяют в 0,1 М буферных солевых растворах. Такая концентрация соли является достаточной, чтобы обеспечить избыток противоионов. При значительно более низких ионных силах возникают сильные электростатические эффекты, которые могут сильно повлиять на гидродинамические измерения. Так, например, вряд ли заряженная нуклеиновая кислота будет диффундировать отдельно от положительных противоионов. Для их разделения потребовалась бы огромная электростатическая энергия. Очевидно, большие макромолекулы и малые ионы движутся совместно, а наблюдаемые транспортные свойства их комплекса являются усредненными свойствами большой и малой молекул.

При высоких концентрациях соли, когда она составляет значительную долю растворителя, раствор макромолекул нужно рассматривать как трехкомпонентную систему, состоящую из соли, воды и макромолекул. Термодинамика такого раствора исключительно сложна, поскольку при рассмотрении взаимодействия любых двух компонентов необходимо учитывать вклад в эти взаимодействия третьего компонента.

В дальнейшем мы не будем рассматривать трудности, связанные с высокой и низкой ионной силой. Представим себе раствор макромолекул как двухкомпонентную систему, состоящую из воды (компонент 1) и макромолекул (компонент 2). В случае идеального раствора его объем выражается суммой удельных объемов отдельных компонентов. Полный объем раствора, содержащего g_1 граммов воды и g_2 граммов макромолекул, равен

$$V_{\text{полн}} = g_1 \bar{V}_1^\Delta + g_2 \bar{V}_2^\Delta \quad (10.6)$$

К сожалению, поведение реальных растворов нельзя описать этой простой формулой. Белки и нуклеиновые кислоты в значительной степени взаимодействуют с молекулами воды, и поэтому их растворы нельзя назвать идеальными. Полярные молекулы достаточно прочно связывают заметное количество молекул воды. Сухие пленки белков прочно ад-

сорбируют около 0,4 моля воды на моль аминокислот. Кроме того, более слабо связывается еще от 1 до 2 молей воды. По данным многих методов для разбавленных растворов характерно сильное взаимодействие вода—биополимер. Например, данные ЯМР указывают на наличие небольшого числа очень прочно связанных с белком молекул воды (от 10 до 50 на молекулу белка).

Калориметрические исследования показывают, что при замораживании раствора белка около двух молей воды на моль аминокислот (0,4 г H_2O на 1 г белка) остаются в незамороженном состоянии. Ясно, что состояние этой воды обусловлено присутствием белка. По данным ЯМР и диэлектрической дисперсии в белковом растворе при комнатной температуре каждая аминокислота ограничивает свободу движения нескольких молекул воды. По-видимому, эти молекулы воды взаимодействуют с белком либо настолько часто, либо настолько прочно, что в результате скорость вращательного движения молекул воды уменьшается. Однако не ясно, тождественны ли эти молекулы тем, которые по данным калориметрии не кристаллизуются при охлаждении. Имеются и другие молекулы воды, связывающиеся с макромолекулами более слабо, но тем не менее вносящие свой вклад в свойства водных растворов белков. Часть воды может задерживаться в полостях или углублениях молекулы белка. Даже не будучи прочно связанной, она будет двигаться с белком, что приведет к увеличению кажущегося размера молекулы белка. Такая вода будет влиять на гидродинамические свойства, но ее нельзя выявить как связанную ни методом ЯМР, ни термодинамическими методами.

Кунтц разработал простой метод для оценки количества прочно связанной воды. Метод основан на исследовании ЯМР замороженного раствора белка при -35°C . Закристаллизовавшаяся вода становится невидимой для метода ЯМР-спектроскопии: поскольку дипольное взаимодействие между замороженными молекулами воды нельзя исключить усреднением, спектр ЯМР становится чрезвычайно широким и твердое состояние воды не регистрируется. Незамороженные молекулы воды еще способны к движению, достаточному для частичного усреднения своего окружения, что приводит к возникновению узкого регистрируемого сигнала ЯМР. Количество незамороженных молекул воды можно вы-

Таблица 10.1

ГИДРАТАЦИЯ РАЗЛИЧНЫХ БИОПОЛИМЕРОВ: СРАВНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ¹⁾

Образец	ЯМР; замораживание	Калориметрия	Гидродинамика ²⁾	Изопиестический метод	Вычисление по ЯМР ³⁾
Овальбумин	0,33	0,32	0,14	0,3	0,37
Бычий сывороточный альбумин	0,40	~ 0,40	0,41	0,32	0,45
Гемоглобин	0,42	0,32	0,63	0,37	0,42
Лизоцим	0,34	~ 0,30	0,46	0,25	0,36
Миоглобин	0,42	—	0,45	0,32	0,45
ДНК	0,59	0,61	—	0,84 ⁴⁾	—

¹⁾ Значения приведены в граммах связанной воды на 1 г дегидратированных макромолекул.

²⁾ Средняя величина гидратации вычислена по данным вязкости, седиментации и диффузии с использованием известного соотношения осей. Где это невозможно, приведены те средние самосогласующиеся гидродинамические значения гидратации, которые представлены в табл. 12.3.

³⁾ В предположении, что все аминокислотные остатки белка полностью гидратированы. Использованы значения гидратации аминокислот, полученные по данным для модельных систем.

⁴⁾ Обеспечивается ближними взаимодействиями.

числить по площади под спектром. Эксперименты проводят при -35°C , поскольку данные о количестве незакристаллизовавшейся воды, полученные при этой температуре, наиболее близки к значениям количества связанной воды, полученным другими методами. Некоторые примеры гидратации биополимеров приведены в табл. 10.1.

Разное количество воды, связываемой разными белками, можно объяснить, исходя из аминокислотного состава белка. Кунтц оценил количество молекул воды, связываемой каждой аминокислотой, по данным исследования пептидов. Количество связанных молекул воды изменяется от 6 — 7 для аниона, подобного глутамату, до 1 для неполярных аминокислот. Эти величины правдоподобны, поскольку ион сольватируется несколькими молекулами воды, и полярные группы должны быть связаны прочными водородными связями с водой, в то время как неполярные остатки связывают воду только у пептидной связи. По данным гидратации аминокислот можно рассчитать вероятное количество воды, связываемой различными белками. Такой расчет находится в хорошем согласии с экспериментальными данными (как это представлено в табл. 10.1).

ТЕРМОДИНАМИКА ГИДРАТАЦИИ

На практике невозможно использовать вышеописанную подробную картину взаимодействия вода—биополимер для расчета гидродинамических свойств белков или нуклеиновых кислот. К тому же нет уверенности, что вклад в гидродинамические свойства обусловлен только прочно связанными молекулами воды. Для объяснения ряда гидродинамических свойств обычно принимают упрощенную модель гидратации. Согласно этой модели, считается связанной вся взаимодействующая с макромолекулой вода независимо от характера и силы связи. Предполагается, что вода заполняет внутреннее пространство, а также покрывает поверхность биополимера, сглаживая неровности. Допускается также, что неполнота информации как о свойствах, так и о количестве связанной воды не имеет существенного значения.

Приблизительная схема модели приведена на рис. 10.7. На самом деле гидратированная поверхность молекулы белка выглядит гораздо сложнее (рис. 2.29).

Предположим, что 1 г данных макромолекул связывает δ_1 граммов воды. Пусть V_1^* — удельный объем этой воды. Если раствор содержит g_1 граммов воды и g_2 граммов дегидратированных макромолекул, то полный объем раствора можно выразить как

$$V_{\text{полн}} = (g_1 - g_2\delta_1)V_1^* + g_2V_2 + \delta_1V_1^*g_2 \quad (10.7)$$

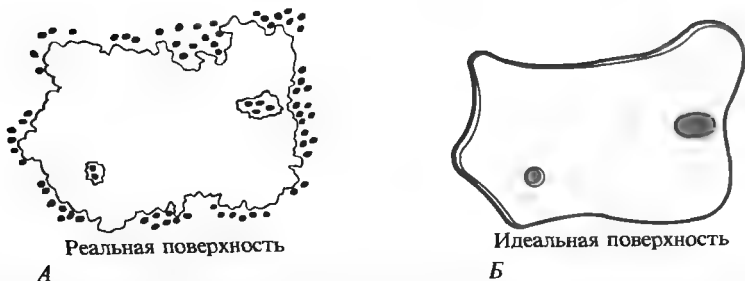


РИС. 10.7. Связывание молекул воды с белком или нуклеиновой кислотой. А. Существует много классов молекул воды, характеризующихся различной прочностью связи с внешними и внутренними областями. Реальная поверхность макромолекулы имеет сложную структуру. Б. Идеализированная поверхность макромолекулы, удобная для интерпретации гидродинамических данных. Поверхность макромолекулы сглажена, вместо отдельных молекул воды рассматривается тонкая водная пленка, расположенная по поверхности макромолекулы, а также вода, заполняющая внутренние полости.

Первый член выражения справа соответствует объему несвязанной воды. Предполагается, что структура ее не нарушена и что она имеет такой же удельный объем ($\bar{V}_1^A$), как и чистая вода. Второй член представляет собой объем макромолекулы. Удельный объем макромолекулы в растворе (V_2) не обязательно равен удельному объему чистой макромолекулы в твердом состоянии ($\bar{V}_2^A$). Третий член соответствует объему связанной воды, удельный объем которой равен V_1^* . В сумме второй и третий члены дают общий объем гидратированных молекул. Поскольку вес одной молекулы равен M/N_0 , легко рассчитать объем гидратированной молекулы $V_{\text{гидр}}$:

$$V_{\text{гидр}} = (M/N_0)(V_2 + \delta_1 V_1^*) \quad (10.8)$$

В таком виде уравнение (10.8) использовать нельзя, поскольку величины V_2 , δ и V_1^* неизвестны, а измерить их практически невозможно. Задачу можно решить термодинамически, заменив эти величины на другие, которые удастся определить экспериментально.

Парциальный удельный объем растворенного вещества $\bar{V}_2$ определяется как изменение объема бесконечно разбавленного раствора при малом приращении количества растворенного вещества. Его можно определить, зная зависимость плотности раствора от весовой концентрации растворенного вещества. Величину $\bar{V}_2$ получают из уравнения (10.7) при условии, что раствор макромолекул сильно разбавлен и поэтому гидратация не зависит от концентрации:

$$\bar{V}_2 = [\partial V_{\text{полн}} / \partial g_2]_{g_1, T} = -\delta_1 \bar{V}_1^A + V_2 + \delta_1 V_1^* \quad (10.9)$$

Используя полученное выражение для $\bar{V}_2$, заменим V_2 и V_1^* в формуле (10.8):

$$V_{\text{гидр}} = (M/N_0)(\bar{V}_2 + \delta_1 \bar{V}_1^A) \quad (10.10)$$

Так как парциальный удельный объем чистого вещества равен его удельному объему, можно заменить $\bar{V}_1^A$ в формуле (10.10) на парциальный удельный объем чистой воды $\bar{V}_1$. Тогда выражение для объема гидратированной макромолекулы в растворе принимает вид

$$V_{\text{гидр}} = (M/N_0)(\bar{V}_2 + \delta_1 \bar{V}_1) \quad (10.11)$$

Поскольку V_1 — это просто величина, обратная плотности чистой воды, а величина V_2 может быть измерена независимо, единственной неизвестной величиной в этом уравнении является гидратация δ_1 . Как указывалось ранее, существует ряд методов, которые позволяют ее измерить.

Экспериментальное определение парциальных объемов часто затруднено тем, что для обычных измерений плотности требуются большие количества исследуемого вещества. Решение этой задачи облегчают точные микровесы. Кроме того, имеется ряд специальных методов, таких, например, как ультрацентрифугирование в смесях $\text{H}_2\text{O}-\text{D}_2\text{O}$ (Edelstein, Schachman, 1973) и определение плотности с помощью механического осциллятора (Kratky et al., 1973). Достаточно точные значения парциального удельного объема белков можно получить, зная аминокислотный состав белка и используя определения удельных объемов индивидуальных аминокислотных остатков белковой молекулы. Значения удельных объемов аминокислот лежат в пределах от $0,60 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$ для Asp до $0,90 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$ для Leu. Как правило, $\bar{V}_2$ для белка равно $0,73 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$, и для всех белков, не содержащих других соединений помимо аминокислот, величина $\bar{V}_2$ лежит в пределах от $0,69$ до $0,75 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$. Нуклеиновые кислоты имеют гораздо большую плотность; так, если противоионом является Na^+ , то значение $\bar{V}_2$ равно $0,50 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$, а если противоионом является Cs^+ , то оно равно $0,44 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$.

На первый взгляд казалось бы разумным в формуле (10.11) отнести член $(M/N_0) V_2$ к объему дегидратированной макромолекулы, а член $(M/N_0)\delta_1 \bar{V}_1$ — к объему связанной во-

ды. Однако такая интерпретация опасна тем, что величины $\bar{V}_2$ и δ зависят от взаимодействия вода—биополимер. Парциальный удельный объем не обязательно равен молекулярному объему. Например, для MgSO_4 величина $\bar{V}_2$ фактически отрицательна. Это происходит из-за того, что Mg^{2+} и SO_4^{2-} связывают воду в гидратном слое так прочно, что добавление MgSO_4 к воде вызывает уменьшение общего объема. В случае макромолекул подобные электрострикционные эффекты не столь велики, но пренебрегать ими нельзя.

Значение объема гидратированной молекулы ($V_{\text{гидр}}$), рассчитанное по формуле (10.10) при подстановке в нее величин гидратации, определенных ЯМР, в большинстве случаев хорошо совпадает с результатами гидродинамических измерений. В этих случаях, очевидно, величина $(M/N_0)\bar{V}_2$ является хорошей оценкой дегидратированного объема. Последний можно вычислить и другим способом, исходя из кристаллической структуры белка. Так, Кунтц показал, что полученное значение дегидратированного молекулярного объема для карбоксипептидазы совпадает с величиной $(M/N_0)\bar{V}_2$ с точностью до нескольких процентов.

Для объяснения гидродинамического поведения типичных глобулярных белков необходимо, чтобы гидратация была равна от 0,3 до 0,4 г H_2O на 1 г белка. Интересно оценить увеличение размера молекулы за счет гидратного слоя. Рассмотрим твердую сферическую молекулу белка с мол. массой 30 000. Если значение $\bar{V}_2$ равно $0,72 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$, то объем дегидратированной молекулы равен $3,6 \cdot 10^4 \text{ \AA}^3$. Объем за счет гидратации, равной $0,34 \text{ г H}_2\text{O} \cdot (\text{г белка})^{-1}$, увеличивается на $1,7 \cdot 10^4 \text{ \AA}^3$, так как удельный объем воды близок к $1 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$. Предположим, что вся вода равномерно распределена по поверхности белка. Вычисляя значения радиусов дегидратированной молекулы (20,5 $\text{\AA}$) и гидратированной молекулы (23,3 $\text{\AA}$) по формуле $(3V/4\pi)^{1/3}$, легко видеть, что толщина гидратного слоя составляет 2,8 $\text{\AA}$. Это эквивалентно мономолекулярному слою воды на поверхности белка. Таким образом, идея о том, что вода связывается именно поверхностью белка, получает по крайней мере качественное обоснование.

ТРЕНИЕ МАКРОМОЛЕКУЛ В РАСТВОРЕ

Чтобы правильно трактовать результаты различных гидродинамических измерений, например скорости седиментации, диффузии или вязкости, необходимо понять характер движения молекул в растворе. Движение молекул в жидкости происходит со значительно меньшей скоростью, чем в газовой фазе, из-за сил трения между молекулами в конденсированной фазе. Представим себе мысленно, что к молекуле с массой m приложена сила F . Уравнение движения молекулы в вакууме описывается формулой $F = ma = m(dv/dt)$, где v — скорость. Реально в жидкости на любую движущуюся частицу действует тормозящая сила трения. Если скорость движения не столь велика, чтобы вызвать турбулентность, то сила трения должна быть пропорциональна скорости. В результате уравнение поступательного движения принимает вид

$$F - fv = m(dv/dt) \quad (10.12)$$

Здесь сила трения fv действует против приложенной силы. Параметр f называется коэффициентом трения поступательного движения. Величина его зависит от рода жидкости.

Линейное дифференциальное уравнение движения в жидкости легко решается. Если скорость макромолекулы в начальный момент времени равна v_0 и параллельна приложенной силе, а $F = \text{const}$, то решение имеет вид

$$v(t) = (F/f) + [v_0 - (F/f)]e^{-ft/m} \quad (10.13)$$

Из этого решения следуют два важных вывода. Во-первых, скорость частицы изменяется лишь в течение очень короткого отрезка времени после того, как приложена внешняя си-

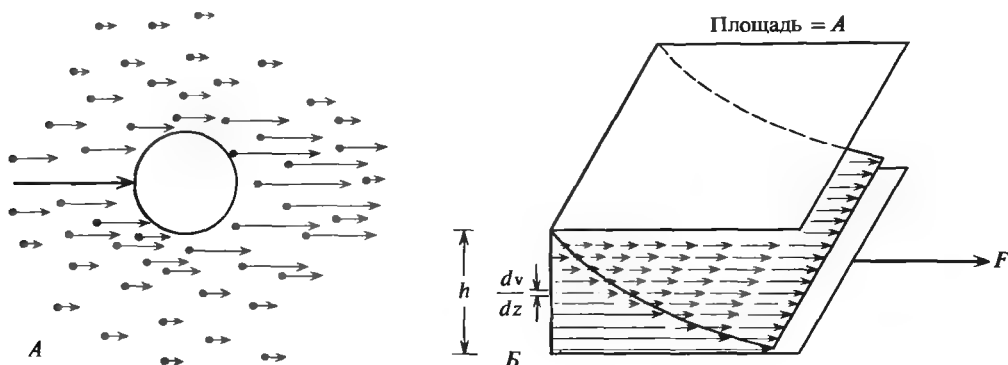


РИС. 10.8. Влияние макроскопического движения на течение жидкости. А. Влияние движущейся макромоллекулы на движение отдельных молекул воды. Броуновское движение молекул воды не учитывается. Б. Распределение скоростей в жидкости при движении одной плоскости относительно другой. Градиент скорости жидкости dv/dz постоянен, если мало h или если относительная скорость плоскостей мала. Однако в общем случае профиль скоростей не обязательно должен быть линейным.

ла. Во-вторых, скорость уменьшается экспоненциально от начальной величины v_0 до постоянной конечной величины $v(\infty) = F/f$, которая пропорциональна приложенной силе.

Время достижения постоянной скорости весьма мало. Для обычной макромоллекулы, имеющей мол. массу 30 000, значение f порядка $5 \cdot 10^{-8} \text{ г} \cdot \text{с}^{-1}$, а m равно $5 \cdot 10^{-20} \text{ г}$. Поэтому переменный член $e^{-ft/m}$ в формуле (10.13) становится пренебрежимо малым через 10^{-12} с . Время релаксации колебаний молекулы такого же порядка.

В простейшем представлении причиной возникновения сил трения в жидкости является взаимное притяжение молекул. Для того чтобы переместить твердый объект в жидкой среде, необходимо переместить несколько молекул жидкости друг относительно друга (рис. 10.8, А). Ближайшие к движущейся частице молекулы растворителя подвергаются наибольшему воздействию (показано самыми длинными стрелками). По мере удаления от этой частицы возмущения, вызванные ею, будут уменьшаться.

Для того чтобы определить силу трения, необходимо вычислить силу, поддерживающую данное распределение скоростей молекул растворителя. Феноменологически эта сила родственна свойству жидкости, называемому вязкостью. Рассмотрим объем жидкости, ограниченный двумя поверхностями (рис. 10.8, Б). Естественно предположить, что сила, необходимая для того, чтобы вызвать скольжение одной поверхности относительно другой, должна быть пропорциональна площади поверхности (A) и должна зависеть от разности скоростей движения поверхностей. Если рассматривать в качестве поверхностей слои жидкости, то при достаточно малой разности скоростей (или же для достаточно близко расположенных слоев жидкости) играет роль только первая производная скорости. В этом случае

$$F = A\eta(dv/dz) \quad (10.14)$$

Коэффициент пропорциональности η называется вязкостью, причем вязкость зависит только от свойств жидкости. Градиент скорости, нормальный к направлению потока, dv/dz , называется скоростью сдвига.

СВЯЗЬ МЕЖДУ ТРЕНИЕМ И РАЗМЕРАМИ МОЛЕКУЛЫ

Для описания движения сферической частицы необходимо вывести уравнение, связывающее коэффициент поступательного трения f частицы с вязкостью жидкости η . Прямой

вывод является крайне сложным, потому что необходимы точные вычисления градиентов скоростей, создаваемых в жидкости движущейся частицей. Масса жидкости должна оставаться постоянной, но в реальном случае движение частицы вызывает флуктуации плотности жидкости. Если их учитывать, это приведет к громоздким алгебраическим выкладкам. Однако вид уравнения можно найти путем анализа размерностей. Единственной переменной для сферической частицы является ее радиус r . Предположим, что f является функцией η и r . В простейшем виде функция может быть записана так:

$$f \propto \eta^x r^y \quad (10.15)$$

Размерность f — $\text{г} \cdot \text{с}^{-1}$; из выражения (10.14) следует, что η должна иметь размерность $\text{г} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, а размерность r — см. Исходя из этого, выражение (10.15) можно написать в виде

$$\text{г} \cdot \text{с}^{-1} = \text{г}^x \cdot \text{см}^{-x} \cdot \text{с}^{-x} \cdot \text{см}^y \quad (10.16)$$

Единственным значением x и y , удовлетворяющим правилу размерности, является $x = y = 1$. Таким образом, получаем $f = \text{const} \cdot \eta \cdot r$.

Величина постоянной не может быть определена из анализа размерностей. Она зависит от граничных условий для потока жидкости у поверхности частицы. Обычно рассматривают два предельных случая. В первом из них поверхность частицы сильно взаимодействует с молекулами жидкости. При этом полагают, что слой жидкости, соприкасающийся с поверхностью частицы, движется со скоростью частицы. Такую смачиваемую поверхность называют липкой. Конечное выражение для коэффициента трения поступательного движения имеет вид

$$f_{\text{сф}} = 6\pi\eta r \quad (10.17)$$

Это выражение носит название *закона Стокса*. В другом предельном случае граничных условий предполагается отсутствие взаимодействия между частицами и молекулами жидкости. Очевидно, в этом случае силы трения меньше, чем в предыдущем. Жидкость просто скользит по поверхности частицы, обтекая ее. Для таких граничных условий $f_{\text{сф}} = 4\pi\eta r$.

До сих пор наше обсуждение касалось поступательного коэффициента трения. Такой же подход применим при рассмотрении торможения вязкой жидкостью вращательного движения частиц. Если к частице в жидкости приложен постоянный вращающий момент τ , то по прошествии какого-то времени угловая скорость частицы достигнет некоторого постоянного значения ω . Параметр, связывающий скорость частицы с вращающим моментом, является вращательным коэффициентом трения $f_{\text{вр}} = \tau/\omega$. Показано, что для граничных условий смачиваемой поверхности вращательный коэффициент трения сферической частицы равен

$$f_{\text{вр}} = 6\eta V \quad (10.18)$$

где V — объем частицы. В том случае, когда в качестве граничных условий принимается несмачиваемая поверхность сферы, $f_{\text{вр}} = 0$. Это очевидно, поскольку вращающаяся сфера не нарушает течение жидкости, если молекулы растворителя не взаимодействуют с ней.

Третий случай — это влияние сферических частиц в жидкости на величину внешней силы, необходимой для поддержания постоянного градиента скорости (постоянной скорости сдвига). Так как рассмотрение этого случая связано с громоздкими и сложными математическими выкладками, мы не будем на нем подробно останавливаться. Однако полезно отметить, что критической переменной для этого случая является объем макромолекулы.

Представляется интересным найти фактическое распределение скоростей растворителя вблизи молекулы, совершающей поступательное или вращательное движение, а также

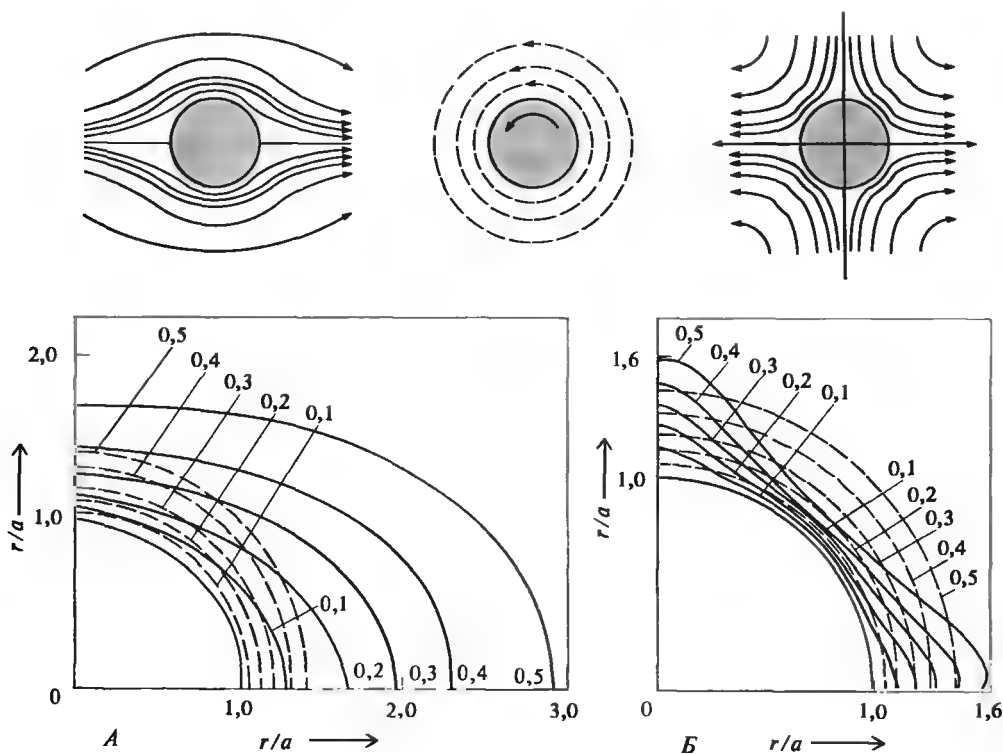


РИС. 10.9. Диаграмма распределения скоростей в жидкости, обтекающей сферу со смачиваемой поверхностью. Для всех рассмотренных случаев обтекания расчет проведен в системе координат, связанной с центром сферы, т.е. в системе, в которой сферическая макромолекула неподвижна. Вверху показано сечение потока жидкости, проведенное через центр молекулы. Внизу приведены диаграммы распределения скоростей в увеличенном масштабе. Распределение скоростей жидкости показано линиями равных скоростей, причем числа у этих линий обозначают скорость жидкости относительно скорости невозмущенного сферой потока. Радиус макромолекулы равен a , и расстояние выражено в единицах a (Kuntz, Kauzmann, 1974). *А.* Сплошные линии относятся к сфере, движущейся слева направо в плоскости сечения жидкости, пунктир — к сфере, которая вращается вокруг оси, перпендикулярной плоскости сечения потока жидкости. *Б.* Пунктирные линии относятся к сфере, вращающейся вокруг оси, перпендикулярной сечению потока жидкости. Сплошные линии относятся к сфере, движущейся в поле линейного градиента скорости, ориентированного под углом 45° , как указано вверху справа.

вблизи молекулы, находящейся в поле градиента скорости растворителя. На рис. 10.9 представлены результаты подробных гидродинамических вычислений. Скорости жидкости вблизи макромолекулы представлены контурными линиями равных скоростей, показывающими изменение скорости в пределах от значения скорости макромолекулы до значения скорости невозмущенной жидкости. Из данных, представленных на рис. 10.9, следует, что нарушения, вызванные частицей, очень быстро уменьшаются с расстоянием.

В случае когда граничным условиям отвечает смачиваемая поверхность, существенное возмущение потока происходит в области, размер которой ограничен мономолекуляр-

ным слоем воды. Этот результат обескураживает. Поверхность макромолекулы вряд ли можно достаточно хорошо описать сглаженной сферой. Для точного гидродинамического описания поведения частицы необходимо принимать во внимание детальную структуру поверхности. Более того, когда с поверхностью связан лишь один слой молекул воды, мы не можем быть уверены в правильности выбора граничных условий. Необходимо принимать во внимание также некоторое проскальзывание. Это приведет к меньшим возмущениям жидкости, поскольку при этом разница в скорости в жидкости и на поверхности макромолекулы станет меньше.

К счастью, эффекты неровной поверхности и отступления от граничных условий для смачиваемой (липкой) поверхности действуют в противоположных направлениях. Поэтому основанное на опыте приближение, схема которого приведена на рис. 10.7, является общепринятым.

Предполагают, что гидратация только увеличивает объем макромолекулы, не изменяя ее формы. Как правило, принимают граничные условия смачиваемой (липкой) поверхности, а неровности поверхности не учитывают. Коэффициенты трения для сферы определяют из уравнений (10.17) и (10.18), но при вычислениях используют значение радиуса или объема с учетом гидратации частицы [уравнение (10.11)]. Таким образом, расчетный коэффициент трения гидратированной сферической макромолекулы объема $V_{\text{гидр}}$ должен быть равен $f_{\text{сф}} = 6\pi\eta(3V_{\text{гидр}}/4\pi)^{1/3}$ и $f_{\text{вр}} = 6\eta V_{\text{гидр}}$.

Для молекул белка в водных растворах расчеты, основанные на этих предположениях, обычно находятся в достаточно хорошем согласии с экспериментом. Более значительные расхождения наблюдаются для меньших молекул или для молекул, более слабо взаимодействующих с растворителем. При анализе движения неполярных молекул в липидных бислоях необходимо обращать серьезное внимание на выбор граничных условий.

ВЛИЯНИЕ ФОРМЫ ЧАСТИЦ НА ТРЕНИЕ ПОСТУПАТЕЛЬНОГО ДВИЖЕНИЯ

Большинство биологических молекул не имеют сферической формы. В основном они представляют собой компактные, глобулярные, часто несимметричные твердые частицы. Более реальной моделью для описания формы таких макромолекул является эллипсоид вращения, сплюснутый или вытянутый. Эллипсоид того и другого вида является предельным случаем эллипсоида общего вида с тремя различными осями (рис. 10.10). Сплюснутый эллипсоид имеет дискообразную форму, образованную вращением эллипса вокруг короткой полуоси b ; обе его длинные полуоси одинаковы. Вытянутый эллипсоид имеет стержнеобразную форму, образованную вращением эллипса вокруг длинной полуоси a ; его короткие полуоси b одинаковы. Для эллипсоида любого вида аксиальное отношение r , определяется как отношение длинной полуоси к короткой (a/b).

Объем сферы равен $(4/3)\pi r^3$, в то время как объем сплюснутого эллипсоида равен $(4/3)\pi a^2b$, а вытянутого — $(4/3)\pi ab^2$. При равных объемах поверхность любого эллипсоида больше, чем поверхность сферы. Естественно предположить, что эллипсоиды имеют больший коэффициент трения, чем эквивалентная сфера, и это предположение подтверждается точными вычислениями. Поскольку объем макромолекулы пропорционален молекулярной массе [уравнение (10.11)], чем больше форма молекулы отклоняется от сферической (при постоянной массе), тем больше становится коэффициент трения.

Для граничных условий смачиваемой поверхности можно получить аналитическое выражение зависимости коэффициента трения эллипсоида от аксиального отношения. Эту зависимость удобно представить как отношение коэффициента трения эллипсоида (f) к коэффициенту трения для сферы того же объема ($f_{\text{сф}}$). Отношение поступательных коэффициентов трения равно

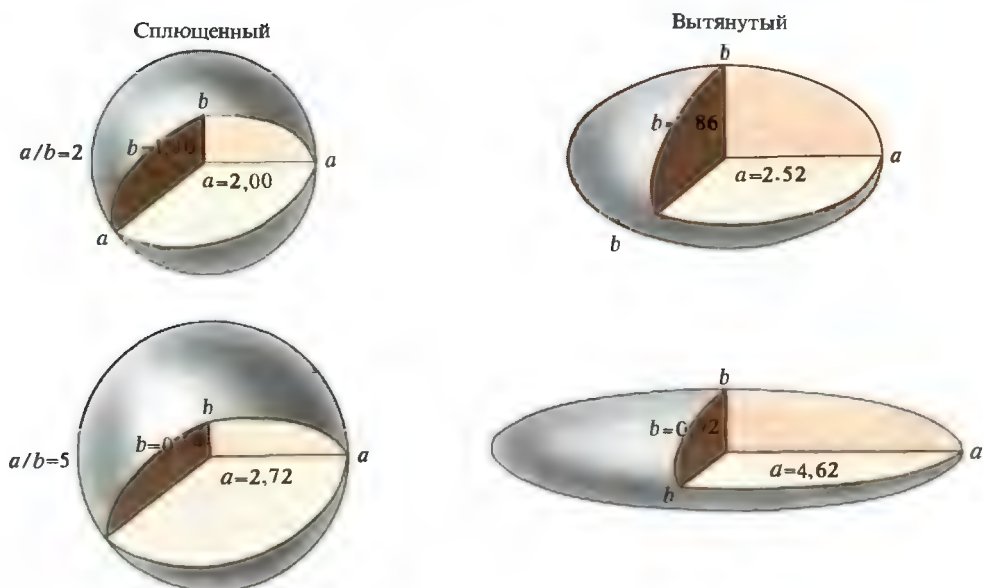


РИС. 10.10. Четыре эллипсоида вращения равного объема. Правый верхний октант вырезан, и в разрезе показана большая (a) и малая (b) полуоси.

$$F = f/f_{\text{сф}} = (1 - p^2)^{1/2} / p^{2/3} \ln\{[1 + (1 - p^2)^{1/2}] / p\} \quad (10.19a)$$

для вытянутого эллипсоида, где $p = b/a = 1/p_r$, и

$$F = f/f_{\text{сф}} = (p^2 - 1)^{1/2} / p^{2/3} \operatorname{arctg} [(p^2 - 1)^{1/2}] \quad (10.19b)$$

для сплюснутого эллипсоида, где $p = a/b = p_r$.

Уравнения (10.19) не всегда удобны для применения. Их численные решения приведены в табл. 10.2. Отношение поступательных коэффициентов трения F часто называют фактором формы или фактором Перрена. Необходимо отметить, что с увеличением аксиального отношения численные значения этих факторов возрастают сравнительно медленно (рис. 10.11). При одинаковом аксиальном отношении коэффициент трения для вытянутого эллипсоида всегда больше, чем для сплюснутого. В случае гидратации выражения (10.19) представляют собой отношения коэффициента трения эллипсоида к коэффициенту трения сферы с тем же объемом гидратной оболочки.

ВЛИЯНИЕ ФОРМЫ НА ВРАЩАТЕЛЬНОЕ ТРЕНИЕ

Коэффициент трения несферических тел описывается девятикомпонентным тензором $\underline{f}$. В уравнениях для поступательного коэффициента трения не было необходимости детально рассматривать этот тензор, так как в большинстве гидродинамических методов обсуждается поток вещества, и при этом нет нужды точно знать ориентацию молекул. Величина наблюдаемого коэффициента трения f является средним по всем компонентам тензора $\underline{f}$. Таким образом, вместо девяти параметров, необходимых для описания $\underline{f}$, нам требуется только одна величина f .

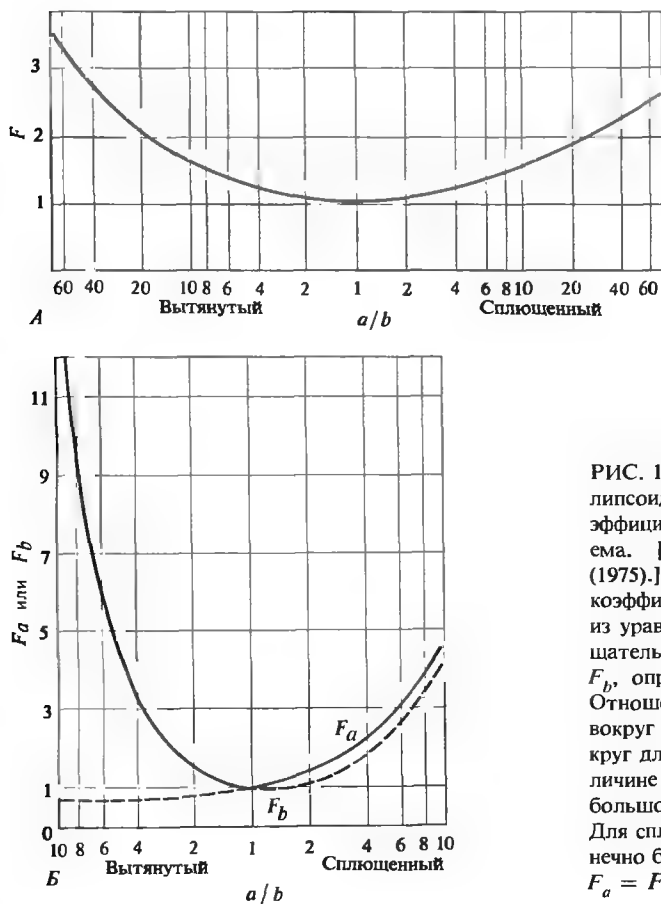


РИС. 10.11. Коэффициенты трения эллипсоидов вращения по отношению к коэффициентам трения сферы равного объема. [Koenig, Biopolymers, 14, 2421 (1975).] А. Отношение поступательных коэффициентов трения F , определенное из уравнения (10.19). Б. Отношения вращательных коэффициентов трения F_a и F_b , определенные из уравнения (10.20). Отношение F_b соответствует вращению вокруг короткой оси, F_a — вращению вокруг длинной оси. F_a приближается к величине $\frac{2}{3}$ при бесконечном увеличении большой оси вытянутого эллипсоида. Для сплюснутого эллипсоида при бесконечно большом увеличении a/b в пределе $F_a = F_b = 3a/4\pi b$.

Однако при рассмотрении вращательного движения необходимо принимать во внимание ориентацию молекул. Нельзя говорить лишь об одном вращательном коэффициенте трения. Так, для эллипсоидов имеются два коэффициента трения: f_a — для вращения вокруг полуоси a и f_b — вокруг полуоси b . Перрен в 1934 г. получил аналитическое выражение этих коэффициентов для граничных условий смачиваемой поверхности. Выведенные им выражения для вращательных коэффициентов трения близки к формулам (10.19) для поступательных коэффициентов трения, но имеют более сложный вид. Эти выражения приводятся здесь в наиболее компактной форме. В них даны значения отношений вращательных коэффициентов трения эллипсоидов к вращательному коэффициенту трения сферы того же объема:

$$F_a = f_a/f_{\text{вп}} = 4(1 - p^2)/3(2 - p^2S) \quad (10.20a)$$

$$F_b = f_b/f_{\text{вп}} = 4(1 - p^4)/3p^2[S(2 - p^2) - 2] \quad (10.20b)$$

При этом для вытянутого эллипсоида

$$S = 2(1 - p^2)^{-1/2} \ln\{[1 + (1 - p^2)^{1/2}]/p\} \quad (10.21a)$$

$$p = b/a = 1/p_r \quad (10.21a)$$

Таблица 10.2

ФАКТОРЫ ФОРМЫ СИМХИ (ν), ПЕРРЕНА (F) И ШЕРАГИ—МАНДЕЛЬКЕРНА (β) ДЛЯ ЭЛЛИПСОИДОВ ВРАЩЕНИЯ¹⁾

Аксиальное отношение	Вытянутый			Сплюснутый		
	ν	F	$\beta \cdot 10^{-6}$	ν	F	$\beta \cdot 10^{-6}$
1	2,500	1,000	2,12	2,500	1,000	2,12
2	2,908	1,044	2,13	2,854	1,042	2,12
3	3,685	1,112	2,16	3,430	1,105	2,13
4	4,663	1,182	2,20	4,059	1,165	2,13
5	5,806	1,250	2,23	4,708	1,224	2,14
6	7,098	1,314	2,28	5,367	1,277	2,14
8	10,103	1,433	2,35	6,700	1,374	2,14
10	13,634	1,543	2,41	8,043	1,458	2,14
15	24,65	1,784	2,54	11,42	1,636	2,14
20	38,53	1,996	2,64	14,80	1,782	2,15
30	74,51	2,356	2,78	21,58	2,020	2,15
40	120,76	2,668	2,89	28,37	2,212	2,15
50	176,81	2,946	2,97	35,16	2,375	2,15
60	242,28	3,201	3,04	41,95	2,518	2,15
80	400,5	3,658	3,14	55,52	2,765	2,15
100	593,7	4,067	3,22	69,10	2,974	2,15
200	2052,9	5,708	3,48	137,01	3,735	2,15

¹⁾ F вычислено по формуле (10.19). Метод вычисления ν и β описан в гл. 12 [см. (12.23) и (12.29)]. Данные взяты из работы Scheraga, 1961.

а для сплюснутого эллипсоида

$$S = 2(p^2 - 1)^{-1/2} \operatorname{arctg} [(p^2 - 1)^{1/2}] \quad (10.22a)$$

$$p = a/b = p_r \quad (10.22b)$$

Следует отметить, что параметр S выражается формулой, сходной с полученными ранее формулами для отношений поступательных коэффициентов трения эллипсоидов [формулы (10.19)]: $S = 2p^{-2/3}/F$.

На рис. 10.11, Б представлены зависимости отношений вращательных коэффициентов трения от аксиального отношения для сплюснутого и вытянутого эллипсоидов. Из рассмотрения этих зависимостей следует несколько важных качественных выводов. В первом приближении сила трения для сплюснутого эллипсоида имеет одно и то же значение при вращении его вокруг длинной (f_a) или короткой (f_b) оси. В любом случае трение для таких эллипсоидов больше, чем для сферы того же объема. Удлиненный эллипсоид вращается вокруг длинной оси f_a легче, чем равная по объему сфера. Однако вращение вокруг короткой оси f_b сопровождается исключительно большим трением. Это и понятно, так как такое движение должно сильно возмущать жидкость. (Для аналогии представьте себе вращение в растворе магнитной мешалки.)

Каждый из вращательных коэффициентов трения связан с временем релаксации вращения τ_r . Эта переменная определяет скорость, с которой анизотропное распределение приходит к равновесию благодаря вращению молекул. Для сферы $\tau_r = f_{вр}/2kT$. Для эллипсоидов (относительно эквивалентной сферы) зависимости имеют следующий вид.

$$\text{Вытянутый эллипсоид:} \quad \tau_a/\tau_r = f_b/f_{вр} \quad (10.23a)$$

$$\tau_b/\tau_r = (2/f_{вр})[(1/f_a) + (1/f_b)]^{-1} \quad (10.23b)$$

$$\text{Сплюснутый эллипсоид:} \quad \tau_b/\tau_r = f_a/f_{\text{вр}} \quad (10.23\text{в})$$

$$\tau_a/\tau_r = (2/f_{\text{вр}})[(1/f_a) + (1/f_b)]^{-1} \quad (10.23\text{г})$$

где τ_a — время релаксации при вращении вокруг длинной оси, а τ_b — вокруг короткой. Смысл этих уравнений можно понять, рассматривая движение вытянутого эллипсоида. Для изменения пространственной ориентации длинной оси (a) нужно вращать эллипсоид вокруг одной из малых осей (b). Вращение вокруг оси a не изменяет ее ориентации. Однако для того, чтобы изменить ориентацию одной из коротких осей, достаточно вращения эллипсоида либо вокруг оси a , либо вокруг b , причем оба этих вращения одинаково эффективны, за исключением того, что вращение вокруг короткой оси связано с большим трением.

Изучение вращения макромолекул позволяет получить параметры, связанные с τ_a и τ_b , но, к сожалению, ни один из перечисляемых ниже методов: ЯМР, дихроизм в электрическом поле, двойное лучепреломление в потоке, диэлектрическая релаксация и поляризация флуоресценции — не позволяет определить τ_a и τ_b прямым способом. В некоторых случаях τ_a и τ_b определяются одновременно с некоторыми другими величинами, о которых нет количественных данных. Определение τ_a и τ_b с помощью метода, основанного на поляризации флуоресценции, представляет огромные трудности. Затухание анизотропии определяется не только величинами τ_a и τ_b ; этот процесс определяется рядом экспонент, в коэффициенты которых помимо прочих факторов вносит вклад ориентация флуоресцентных зондов относительно главных осей эллипсоида (гл. 8). Другие методы, такие, как метод статистической поляризации флуоресценции или неньютоновской вязкости, позволяют определить только среднюю гармоническую величину τ_a и τ_b . Для вытянутого эллипсоида $\tau_{\text{гидр}}^{-1} = 1/3 [\tau_a^{-1} + 2(\tau_b)^{-1}]$, и соответствующее среднее значение вращательного коэффициента трения равно $f_{\text{гидр}} = (2\tau_{\text{гидр}})^{-1}$.

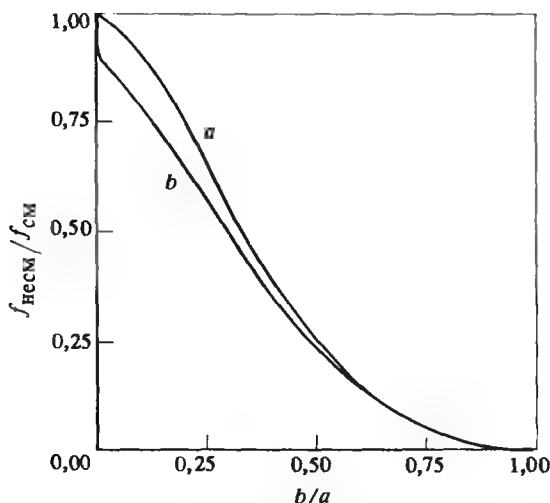


РИС. 10.12. Влияние граничных условий на вращательные коэффициенты трения. Кривая a соответствует вращению сплюснутого эллипсоида вокруг длинной оси, кривая b — вращению вытянутого эллипсоида вокруг короткой оси. Результаты представлены в виде зависимости от обратной величины аксиального отношения b/a , что позволяет рассматривать их при бесконечном аксиальном отношении. [Bauer et al., J. Am. Chem. Soc., 96, 6840 (1974).]

К сожалению, независимое определение τ_a и τ_b является трудной задачей, несмотря на то что вращательное трение по сравнению с поступательным более чувствительно к форме макромолекулы, как это следует из данных рис. 10.11, А и 10.11, Б. Вращательному коэффициенту трения свойственна также большая чувствительность к выбору граничных условий. Для сферы эта зависимость уже обсуждалась. Если в качестве граничных условий мы берем несмачиваемую поверхность эллипсоидов, поступательное трение изменится лишь немного, тогда как вращательное движение очень чувствительно к выбору граничных условий. Для несмачиваемой поверхности в случае вращения вокруг длинной оси вытянутого эллипсоида или вокруг короткой оси сплющенного эллипсоида трение вообще отсутствует. Наоборот, вращение этих эллипсоидов вокруг остальных осей по мере увеличения аксиального отношения становится все более затруднительным. Цванциг вычислил, что в предельном случае увеличения аксиального отношения вращательный коэффициент трения становится независимым от граничных условий при вращении сплющенного эллипсоида вокруг длинных осей или вытянутого вокруг коротких осей (рис. 10.12).

● ТРЕНИЕ ПРИ ПОСТУПАТЕЛЬНОМ ДВИЖЕНИИ МОЛЕКУЛ СЛОЖНОЙ ФОРМЫ

В тех нередких случаях, когда эллипсоид вращения неудовлетворительно отражает форму биополимера, предпринимаются попытки описать гидродинамические свойства макромолекулы, обращаясь к более сложным моделям. Кирквуд и Райзман предложили приближенный способ описания гидродинамических свойств макромолекул, состоящих из идентичных субъединиц. Здесь приводятся два основных приложения этого способа для линейных или клубкообразных полимеров и для олигомерных белков. Линейный или клубкообразный полимер может быть аппроксимирован цепочкой бусинок, каждая из которых обладает одними и теми же гидродинамическими свойствами. Моделью олигомерного белка может служить набор идентичных субъединиц, также обладающих одинаковыми гидродинамическими свойствами. Основное, на что нужно обратить внимание в этих двух случаях, — это гидродинамические взаимодействия между субъединицами. Ограничимся рассмотрением поступательного движения полимера, имеющего N сегментов или субъединиц. Каждая субъединица при движении вызывает нарушения распределения скорости в жидкости, которые в свою очередь влияют на другие субъединицы.

Необходимо определить изменение скорости Δv в жидкости на расстоянии r от одной из субъединиц, действующих на жидкость с силой $F^{(1)}$:

$$\Delta v = \underline{T} \cdot F \quad (10.24)$$

Тензор $\underline{T}$, описывающий изменение скорости, называется тензором Озеена и имеет вид

$$\underline{T} = (1/8\pi\eta r)(\underline{I} + \underline{rr}^*/r^2) \quad (10.25)$$

где r — расстояние, а $\underline{I}$ (единичный тензор) и $\underline{rr}^*$ определяются как

$$\underline{I} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad \underline{rr}^* = \begin{pmatrix} x^2 & xy & xz \\ xy & y^2 & yz \\ xz & yz & z^2 \end{pmatrix} \quad (10.26)$$

Если скорость сдвига в растворе настолько мала, что в нем нет преимущественной ориентации полимерных молекул, то тензорное взаимодействие можно усреднить по всем

¹⁾ Здесь следует применять тензорную форму уравнений, так как изменение скорости не обязательно параллельно вызвавшей его силе.

ориентациям. Получаемое при этом среднее является просто следом тензора. Для жесткой системы $\langle \mathbf{r}^* \rangle = (1/3)(x^2 + y^2 + z^2)\mathbf{I} = (1/3)r^2\mathbf{I}$, и, следовательно, среднее тензора Озеена равно

$$\langle \mathbf{T} \rangle = (1/8\pi\eta r)[\mathbf{I} + (1/3)\mathbf{I}] = \mathbf{I}/6\pi\eta r \quad (10.27)$$

Гибкая система описывается этим же выражением, но в этом случае вместо фиксированного расстояния r необходимо использовать среднее значение $\bar{r}$.

Предположим, что жидкость в целом движется с постоянной скоростью $\mathbf{v}^0$. Локальное значение скорости жидкости $\mathbf{v}_i$ у i -го сегмента полимера в растворе будет отличаться от скорости $\mathbf{v}^0$ из-за гидродинамического взаимодействия этого сегмента с остальными сегментами (рис. 10.13, А). Сегмент j изменяет скорость жидкости у i -го сегмента на величину $\Delta \mathbf{v}_{ij}$. Из уравнений (10.24) и (10.27) следует, что значение локальной скорости i -го сегмента равно

$$\mathbf{v}_i = \mathbf{v}^0 + \sum_{j \neq i} \Delta \mathbf{v}_{ij} = \mathbf{v}^0 + (1/6\pi\eta) \sum_{j \neq i}^N (1/r_{ij})\mathbf{F}_j \quad (10.28)$$

где r_{ij} — расстояние между i -м и j -м сегментами, а $\mathbf{F}_j$ — сила, обусловленная действием j -го сегмента на жидкость. Следует, однако, помнить, что если полимер гибкий или имеет некоторое распределение структурных субъединиц, то каждое значение r_{ij} этого выражения должно быть заменено усредненной величиной.

Сила воздействия i -го сегмента на жидкость определяется разностью скоростей этого сегмента $\mathbf{u}_i$ и жидкости $\mathbf{v}_i$ вблизи него:

$$\mathbf{F}_i = \zeta(\mathbf{u}_i - \mathbf{v}_i) \quad (10.29)$$

где ζ — коэффициент трения сегмента. Уравнение (10.29) является точным эквивалентом уравнения (10.13) в условиях, когда переменный член уравнения (10.13) исчезает. Необходимо вычислить коэффициент трения f всего полимера. Он определяется общей силой $\mathbf{F}$, действующей со стороны полимера на жидкость, и скоростью центра масс $\mathbf{u}$ относительно скорости жидкости $\mathbf{v}^0$:

$$\mathbf{F} = f(\mathbf{u} - \mathbf{v}^0) \quad (10.30)$$

Простое механическое рассмотрение позволяет сделать два важных упрощения. Первое из них заключается в том, что суммарная сила действия полимера на жидкость является суммой сил, вносимых каждым отдельным сегментом:

$$\mathbf{F} = \sum_{i=1}^N \mathbf{F}_i \quad (10.31)$$

Второе упрощение состоит в том, что в стационарном режиме средняя скорость любого сегмента равна скорости центра масс $\mathbf{u}$. При усреднении это упрощение справедливо (иначе полимер деформировался бы при движении), но для каждого данного момента оно не обязательно. Уравнение (10.29) принимает вид:

$$\mathbf{F}_i = \zeta(\mathbf{u} - \mathbf{v}_i) \quad (10.32)$$

Теперь уравнения (10.32) и (10.28) являются системой $2N$ линейных уравнений с $2N$ неизвестными: $\mathbf{v}_i$ и $\mathbf{F}_i$ для $i = 1, 2, \dots, N$. Эти уравнения можно решить с учетом строения полимера, которое в общем характеризуется величинами r_{ij}^{-1} . Результаты решения этих уравнений совместно с уравнениями (10.30) и (10.31) позволяют получить в неожиданно компактной форме выражение для коэффициента трения

$$f = N\zeta \left/ \left[1 + (\zeta/6\pi\eta N) \sum_i \sum_{j \neq i} r_{ij}^{-1} \right] \right. \quad (10.33)$$

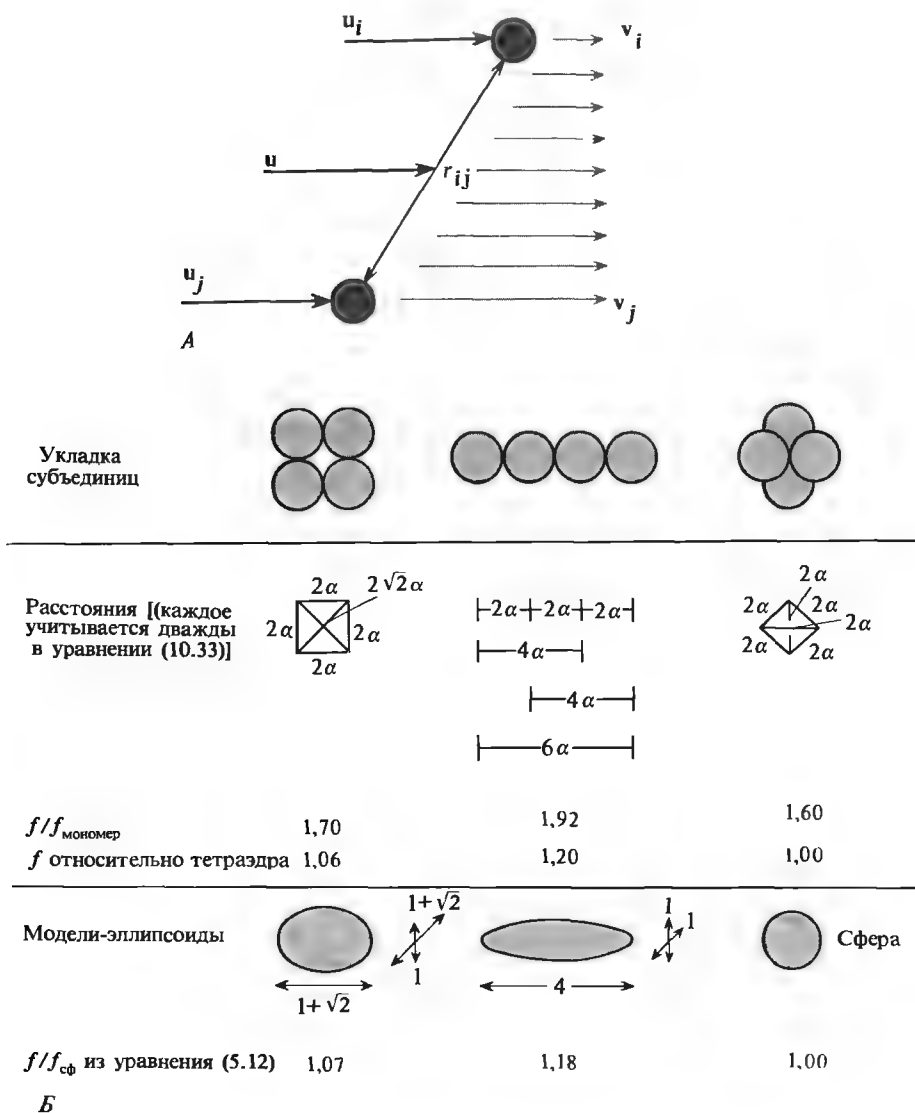


РИС. 10.13. Влияние гидродинамического взаимодействия на трение. А. Схема гидродинамического взаимодействия двух сегментов полимера. Сегменты движутся со скоростями u_i , u_j , а жидкость соответственно со скоростями v_i и v_j . Центр масс движется со скоростью u . Расстояние между двумя сегментами r_{ij} . Б. Три способа укладки четырех идентичных субъединиц белка. Влияние формы молекулы на коэффициент трения вычислено по теории Кирквуда — Райзмана (вверху) и для эллипсоидных моделей (внизу).

Здесь приведена лишь общая схема вывода уравнения (10.33). В действительности одновременное решение $2N$ уравнений включает допущения, справедливость которых должна быть впоследствии доказана в каждом конкретном случае. Более того, в действительности пространственное усреднение необходимо проводить не для тензора $\underline{T}$, а для обратного тензора трения $\underline{f}^{-1}$, поскольку фактически измеряется последняя величина. Более подробно этот вопрос разобран в работе Блумфилда и др. (Bloomfield et al., 1967).

КОЭФФИЦИЕНТЫ ТРЕНИЯ ОЛИГОМЕРОВ И ПОЛИМЕРОВ

Уравнение (10.33) поддается сравнительно простой физической интерпретации. Рассмотрим неподвижный полимер и движущуюся жидкость. Если нет гидродинамического взаимодействия между сегментами, коэффициент трения полимера должен быть просто суммой коэффициентов трения сегментов. Для N одинаковых сегментов $f = N\zeta$. При наличии гидродинамического взаимодействия коэффициент трения меньше чем $N\zeta$, как следует из уравнения (10.33). Это происходит из-за того, что в среднем каждый сегмент уменьшает скорость жидкости около себя. В результате сегмент подвергается меньшему воздействию потока жидкости и, следовательно, испытывает меньшую силу трения.

Уравнение (10.33) позволяет вычислить коэффициент трения любого объекта. Чтобы использовать это уравнение для олигомерной формы белка, состоящего из N одинаковых сферических субъединиц с радиусом R , заменим коэффициент трения сегмента ζ на $6\pi\eta R$ (коэффициент трения одной субъединицы f_m). Из уравнения (10.33) для удобства определим отношение коэффициента трения олигомера к коэффициенту трения одной субъединицы. Если измерять расстояние между субъединицами r_{ij} в единицах, равных радиусу субъединицы, то

$$f/f_m = N \left[1 + (1/N) \sum_i \sum_{j \neq i} \alpha_{ij}^{-1} \right]^{-1} \quad (10.34)$$

где $\alpha_{ij} = r_{ij}/R$. Для примера рассмотрим белок, состоящий из четырех идентичных субъединиц. Имеются три наиболее вероятных способа расположения субъединиц: линейное, плоское квадратное и тетрагональное. На рис. 10.13, Б приведены значения относительных коэффициентов трения для каждого из этих расположений субъединиц, а также указаны использованные в вычислениях расстояния. Отметим, что наиболее компактная тетрагональная форма имеет наименьший коэффициент трения. Линейная форма, наиболее протяженная, имеет соответственно наибольший коэффициент трения. При этом, однако, наибольшее различие между коэффициентами трения этих трех форм составляет всего 20%.

Для достаточно регулярных структур значения, получаемые с помощью уравнения (10.34), находятся в хорошем соответствии с результатами вычислений, в которых форма аппроксимируется эллипсоидом вращения и используются факторы формы Перрена (табл. 10.2). Например, тетраэдр можно грубо аппроксимировать сферой, полимер с линейным расположением субъединиц — вытянутым эллипсоидом с соотношением осей 4:1 и полимер с квадратным расположением — сплюснутым эллипсоидом с соотношением осей $(1 + \sqrt{2}):1$. В случае одинакового объема всех трех форм вычисленные для них значения отношений коэффициента трения к коэффициенту трения для тетраэдра отличаются не более чем на 1-2% от значений, полученных из уравнения (10.34). В предельном случае сильно вытянутого эллипсоида оба выражения (10.34) и (10.19а) дают значение $N/\ln N$. В случае неправильной формы макромолекулы ее аппроксимация эллипсоидом вращения становится неправомерной, и тогда необходимо применять уравнение (10.34).

Все эти результаты приведены для предельного случая непротекаемой структуры макромолекулы, что соответствует максимальному гидродинамическому взаимодействию

между сегментами полимера. В противоположном предельном случае свободного протекания предполагается отсутствие гидродинамического взаимодействия, т.е. предполагается, что каждый сегмент полимера взаимодействует с невозмущенной жидкостью. Это может быть справедливым для полимера с пространственно разделенными субъединицами, которые скреплены звеньями, не обладающими трением. В этом случае тензор Озесна равен нулю, уравнение (10.34) неприменимо и коэффициент трения полимера просто равен Nf_m . При компактном расположении сегментов, как это имеет место у олигомерных белков, субъединицы настолько плотно упакованы, что нет сомнений в том, что такая глобула сходна с непротекаемой частицей, непроницаемой для растворителя. Не столь очевиден выбор условия для таких рыхлых структур, как статистический клубок. В данном случае следует рассчитать количество растворителя, находящегося внутри клубка и движущегося вместе с ним, и количество растворителя, свободно проходящего через клубок. Необходимо также рассчитать предполагаемое пространственное распределение сегментов полимера. Уравнение (10.34) позволяет получить выражение для коэффициента трения полимера, о котором известно, что он имеет статистическое распределение сегментов клубка. Результаты таких расчетов приведены в гл. 19.

Важно отметить, что гидродинамическое взаимодействие, описываемое уравнением (10.28), не ограничивается взаимодействием сегментов одной и той же молекулы полимера. Такие же взаимодействия возникают между разными молекулами в концентрированных растворах. Однако возникающие при этом эффекты носят очень сложный характер, поэтому исследование гидродинамических свойств лучше всего вести в как можно более разбавленных растворах. На практике параметры, характеризующие трение макромолекулы в растворе, определяются для бесконечно разбавленного раствора. Для этого зависимость того или иного параметра от концентрации макромолекул экстраполируется к условиям бесконечного разбавления.

10.3. Диффузия макромолекул

Теперь перейдем от вопросов теории гидродинамических свойств отдельных молекул к рассмотрению некоторых экспериментальных методов, с помощью которых изучают гидродинамику растворов макромолекул. При применении каждого из этих методов возникает ряд проблем. Необходимо связать экспериментально полученные параметры раствора как целого с движением отдельных невидимых молекул, а также учесть влияние любой гетерогенности макромолекул на усредненные свойства всей системы. При этом не следует забывать о межмолекулярных взаимодействиях, возникающих при достаточно высоких концентрациях растворов.

Для книг такого рода, как наша, стало традицией начинать изложение гидродинамических методов с описания диффузии, и не потому, что изучение диффузии является мощным или часто применяемым методом. В действительности измерения диффузии макромолекул в растворе очень трудны. Более того, экспериментальные данные по диффузии не дают сведений о форме макромолекулы или молекулярной массе, если одна из этих величин не определена заранее. Тем не менее в общем среди гидродинамических методов метод диффузии является самым простым, и в отличие от других методов в нем пользуются уравнениями, решения которых имеют удобный аналитический вид. В последние годы как весьма перспективный способ быстрого и точного исследования диффузии развивается метод неупругого светорассеяния. Этот метод, который, возможно, вновь возродит интерес к изучению диффузии, кратко обсуждается в гл. 14. Более детально с ним можно ознакомиться в книге Берна и Пекоры (Berne, Pecora, 1975).

ПЕРЕНОС МАССЫ КАК ПОТОК ВЕЩЕСТВА

При изучении диффузии и других процессов переноса, таких, как седиментация и электрофорез, исследуют перемещение вещества в целом. Наиболее простая, представляющая интерес с биологической точки зрения система должна состоять из двух компонентов. Это растворитель (компонент 1), которым обычно является вода, и находящиеся в нем макромолекулы растворенного вещества (компонент 2). Большинство экспериментов проводится в замкнутой системе. Поэтому любое перемещение растворенного вещества в системе должно компенсироваться соответствующим перемещением растворителя. Поскольку такого рода изменения в системе взаимосвязаны, практически достаточно рассмотреть движение лишь растворенного вещества. Когда имеют дело с разбавленными растворами, поведением растворителя можно пренебречь. Однако это не всегда справедливо для растворов высокой концентрации. Вообще говоря, предполагается, что молекулярная масса растворенного вещества неизвестна, а следовательно, неизвестно также и число молекул, находящихся в растворе. Поэтому удобнее всего описывать перенос растворенного вещества как перенос массы.

Поток J_2 определяется скоростью переноса массы через единицу поверхности:

$$J_2 = dm_2/dt \text{ (г} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}\text{)} \quad (10.35)$$

где m_2 — количество граммов растворенного вещества по одну сторону единичной поверхности. Если c_2 — весовая концентрация вещества у поверхности, а $\langle v_2 \rangle$ — средняя скорость, то выражение для потока принимает вид

$$J_2 = c_2 \langle v_2 \rangle \quad (10.36)$$

Перемещение вещества возникает только под действием на раствор силы. Если рассматривать достаточно малые силы, то поток вещества линейно зависит от приложенных сил:

$$J_2 = \sum_{i=1}^N L'_{2i} X_i \quad (10.37)$$

Здесь учитывается то, что обобщенные силы X_i действуют на каждый компонент. Величины L'_{2i} являются феноменологическими коэффициентами, которые связывают силу, приложенную к i -му компоненту, с результирующим потоком компонента 2. В уравнении (10.37) подразумевается, что действие силы на компонент 1 (растворитель или какой-либо другой компонент) может влиять на движение компонента 2, даже если сила не приложена непосредственно к компоненту 2. Например, заряженные молекулы растворенного вещества движутся под действием электрического поля, что может приводить к движению макромолекул, даже если они не заряжены. Можно переопределить коэффициенты L'_{2i} таким образом, чтобы исключить рассмотрение поведения растворителя (компонента 1) в уравнении (10.37). Для этого нужно ввести для поверхности, через которую рассматривается поток вещества, специальную систему координат (Дополнение 10.1). В общем случае имеем

$$J_2 = \sum_{i=2}^N L_{2i} X_i \quad (10.38)$$

что для двухкомпонентной системы сводится к простому соотношению

$$J_2 = L_{22} X_2 \quad (10.39)$$

В каждое X_i вносят свой вклад два типа сил. Электрические и гравитационные поля и т.п. являются внешними силами F_i . Это реальные физические силы. Кроме того, если кон-

Дополнение 10.1

УРАВНЕНИЕ ПОТОКА ВЕЩЕСТВА
В РАЗНЫХ СИСТЕМАХ КООРДИНАТ

Ранее рассматривался поток вещества через поверхности, неподвижные относительно ячейки, в которой проводится опыт. Поток растворенного вещества через такую поверхность описывается уравнением (10.36)

$$(J_2)_я = c_2 \langle v_2 \rangle_я$$

где индекс «я» обозначает систему координат, связанную с ячейкой.

Можно выбрать поверхность, движущуюся со скоростью растворителя. В системе координат, связанной с растворителем (обозначим эту систему координат индексом «р»), поток растворенного вещества равен

$$(J_2)_р = c_2 (\langle v_2 \rangle_я - \langle v_1 \rangle_я)$$

где $\langle v_1 \rangle_я$ — скорость растворителя в системе координат, неподвижной относительно ячейки. Объединяя два вышеприведенных уравнения, получаем

$$(J_2)_р = (J_2)_я - c_2 \langle v_1 \rangle_я$$

Рассматривая скорость $\langle v \rangle_{об}$ всего объема образца в целом у поверхности, можно использовать третью систему координат

$$\langle v \rangle_{об} = \sum_{i=1}^N \bar{V}_i c_i \langle v_i \rangle_я$$

где $\bar{V}_i$ — объем только компонента i и $\langle v_i \rangle_я$ — его скорость в системе координат, неподвижной относительно ячейки. Результирующий поток компонента 2 в системе координат, связанной с объемом, выглядит следующим образом:

$$(J_2)_{об} = c_2 (\langle v_2 \rangle_я - \langle v \rangle_{об}) = (J_2)_я - c_2 \langle v \rangle_{об}$$

Заметим, что если раствор несжимаем и если объем не изменяется при смешивании различных компонентов, то $\langle v \rangle_{об} = 0$ и $(J_2)_{об} = (J_2)_я$.

В каждой системе координат можно написать феноменологическое уравнение для потока [уравнение (10.37)] с учетом коэффициентов, которые определены для данной выбранной системы. Для системы R

$$(J_2)_R = \sum_{i=1}^N (L_{2i})_R X_i$$

Можно показать, что для системы координат, связанной с объемом или растворителем (Fujita, 1975),

$$(J_2)_R = \sum_{i=2}^N (L_{2i})_R X_i$$

Следовательно, правильная форма уравнения (10.38) имеет вид

$$(J_2)_я = (J_2)_{об} = \sum_{i=2}^N (L_{2i})_{об} X_i$$

центрация растворенного вещества неоднородна, возникает диффузионная сила X_{Di} , которая характеризует тенденцию броуновского движения восстанавливать равномерное распределение всех компонентов системы. Фактически сила, обуславливающая броуновское движение, возникает из-за столкновений с молекулами растворителя. Однако проще интерпретировать эту силу с позиций термодинамики.

Любая сила $\mathbf{F}$ может быть представлена как отрицательный градиент функции потенциальной энергии ϕ , так что $\mathbf{F} = -\nabla\phi$, где $\nabla = \hat{i}d/dx + \hat{j}d/dy + \hat{k}d/dz$. Знак минус означает, что сила всегда действует в направлении движения системы к состоянию с более низкой энергией. Потенциалом компонента раствора является просто химический потенциал μ . Концентрацию растворенного вещества мы будем выражать в $\text{г} \cdot \text{см}^{-3}$, и поэтому $\hat{\mu}$ удобно определять как $\partial G/\partial m$, где G — свободная энергия Гиббса, а m — масса отдельного компонента. Таким образом, $\hat{\mu}$ есть химический потенциал в единицах весовой концентрации, т.е. на грамм данного компонента в данном растворе (Дополнение 10.2).

Для растворенного вещества $\hat{\mu}_2 = \hat{\mu}_2^0 + (RT/M_2) \ln a_2$, где M_2 — молекулярная масса, $\hat{\mu}_2^0$ — химический потенциал исходного состояния (им определяется энергетическая шкала), а a_2 — активность растворенного вещества.

Дополнение 10.2

ХИМИЧЕСКИЕ ПОТЕНЦИАЛЫ

Химический потенциал определяется как парциальная молярная свободная энергия

$$\mu = \partial G/\partial n$$

где n — число молей данного компонента смеси. Химический потенциал μ связан с активностью a и химическим потенциалом в стандартном состоянии (μ^0) соотношением

$$\mu = \mu^0 + RT \ln a$$

Здесь a — безразмерная величина, которая связана с молярной концентрацией C соотношением $a = \gamma C$, где γ — коэффициент активности. По определению стандартным состоянием в этом уравнении является состояние, при котором активность равна единице. Такое состояние рассматривается как состояние некоего гипотетического раствора единичной молярной концентрации, в котором каждая молекула ведет себя так, как если бы она находилась в бесконечно разбавленном растворе. Таким образом, по определению значение γ стремится к 1 $\text{кг} \cdot \text{моль}^{-1}$, когда C стремится к 1 $\text{моль} \cdot \text{кг}^{-1}$. При низких концентрациях или для идеального раствора $a = C$ ($\text{моль} \cdot \text{кг}^{-1}$), так что значение γ приближается к 1 $\text{кг} \cdot \text{моль}^{-1}$ и $d\gamma/dC = 0$ (см. Atkins, 1976, с. 232 — 237 и 311 — 313).

При измерении концентрации в весовых единицах химический потенциал $\hat{\mu}$ связан с μ простым соотношением

$$\hat{\mu} = \mu/M = \mu^0/M + (RT/M) \ln a = \hat{\mu}^0 + (RT/M) \ln \hat{\gamma}c$$

где M — молекулярная масса, c — концентрация в $\text{г} \cdot \text{см}^{-3}$, $\hat{\mu}^0$ — химический потенциал в единицах весовой концентрации, в стандартном состоянии равный 1 $\text{г} \cdot \text{см}^{-3}$, а коэффициент активности $\hat{\gamma}$ определен так, что его значение стремится к 1 $\text{см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$, когда значение c стремится к 1 $\text{г} \cdot \text{см}^{-3}$. При низких концентрациях или в идеальных растворах $\hat{\gamma}$ равняется 1 $\text{см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$ и $d\hat{\gamma}/dc = 0$.

Активность связана с концентрацией растворенного вещества коэффициентом активности γ : $a_2 = \gamma c_2$. Диффузионная сила при конечной концентрации равна

$$X_{D2} = -\nabla \hat{\mu}_2 = -(RT/M_2)\nabla \ln a_2 \quad (10.40)$$

При достаточном разбавлении коэффициент активности приближается к 1, так что $a_2 = c_2$, поэтому диффузионную силу, действующую на компонент 2, можно представить в виде

$$X_{D2} = -\nabla \hat{\mu}_2 = -(RT/M_2)\nabla \ln c_2 \quad (10.41)$$

Суммарный поток компонента 2 в многокомпонентной системе описывается выражением

$$J_2 = \sum_{i=2}^N L_{2i}(F_i - \nabla \hat{\mu}_i) \quad (10.42)$$

Отсюда видно, что градиент химического потенциала всех i компонентов (не только компонента 2) может влиять на общий перенос компонента 2.

Уравнение (10.42) можно значительно упростить, так как в большинстве случаев перенос вещества рассматривают как одномерный процесс. Если система состоит только из двух компонентов, то для одномерного случая

$$J_2 = L_{22}[F_2 - (\partial \hat{\mu}_2 / \partial x)_T] \quad (10.43)$$

Эта основная формула будет использоваться в дальнейшем для описания различных гидродинамических опытов. Диффузия проста, в частности, тем, что этот процесс протекает без приложения внешних сил:

$$J_2 = -L_{22}(\partial \hat{\mu}_2 / \partial x)_T \quad (10.44)$$

Последняя задача заключается в определении коэффициента L_{22} . Простейший способ сделать это — сначала описать диффузионный эксперимент, а затем дать термодинамическое объяснение полученных результатов.

ЗАКОНЫ ДИФфуЗИИ ФИКА

Рассмотрим образец, приготовленный наложением чистого растворителя на равный объем раствора макромолекул. При постоянной температуре и давлении резкая начальная граница между растворенным веществом и растворителем со временем будет постепенно размываться, и в конце концов растворенное вещество равномерно распределится по всему объему (рис. 10.14). Перераспределение растворенного вещества обусловлено диффузией, и анализ диффузионного процесса должен дать величину L_{22} . Для дальнейшего рассмотрения удобно выразить химические потенциалы через концентрации. При бесконечном разбавлении $(\partial \hat{\mu}_2 / \partial x)_T = (RT/c_2 M_2)(\partial c_2 / \partial x)_T$, и уравнение (10.44) приобретает вид

$$J_2 = -(L_{22}RT/M_2 c_2)(\partial c_2 / \partial x)_T = -D(\partial c_2 / \partial x)_T \quad (10.45)$$

где коэффициент диффузии D равен $L_{22}RT/c_2 M_2$. Как правило, значение коэффициента диффузии определяется экспериментально. Вначале мы опишем методы измерения этой величины, а затем покажем, как можно интерпретировать D и L_{22} на молекулярном уровне [уравнение (10.66)].

Выражение, стоящее в правой части уравнения (10.45), было впервые предложено еще в XIX столетии Фиком, который получил его по аналогии с тем, как это было сделано для потока тепла при наличии градиента температуры. Уравнение (10.45), известное как первый закон диффузии Фика, можно вывести и иным путем.

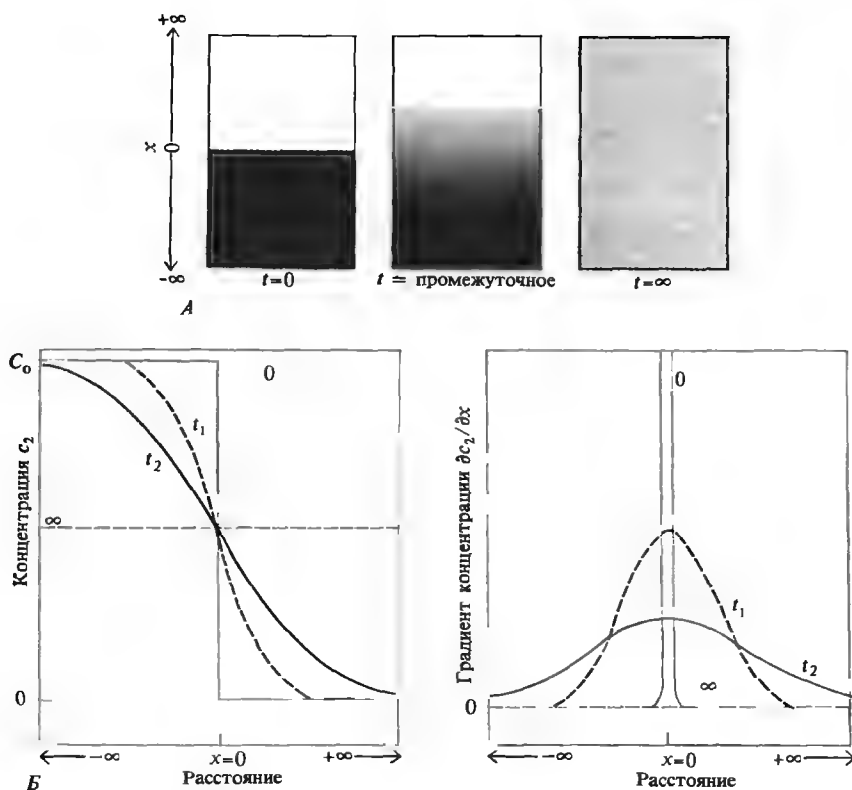


РИС. 10.14. Свободная диффузия (С.Tanford, 1961). А. Схема измерения свободной диффузии. Б. Концентрация растворенного вещества и градиент концентрации в моменты времени 0 , t_1 , t_2 и ∞ в опыте по изучению свободной диффузии. В начальный момент времени сформирована резкая граница, как это показано на схеме А.

Рассмотрим тонкий слой жидкости, ограниченный поверхностями x и $x + dx$ единичной площади (рис. 10.15). Толщина dx должна быть такой, чтобы концентрация растворенного вещества менялась незначительно от $c_2(x)$ с одной стороны слоя до $c_2(x + dx)$ — с другой. Скорость переноса вещества слева направо через слой должна быть прямо пропорциональна концентрации вещества у левой границы слоя $c_2(x)$ и обратно пропорциональна толщине слоя dx . Скорость переноса вещества в противоположном направлении пропорциональна $c_2(x + dx)/dx$. Обозначив коэффициент пропорциональности буквой D , найдем результирующую скорость переноса массы, равную разности между этими двумя скоростями. Таким образом, в предельном случае тонкого слоя поток равен

$$J_2 = [Dc_2(x) - Dc_2(x + dx)]/dx = -D(\partial c_2 / \partial x)_t \quad (10.46)$$

Полученный результат идентичен уравнению (10.45). Заметим, что если концентрация увеличивается слева направо, т.е. с увеличением x , то J_2 является отрицательным, и поток массы растворенного вещества будет направлен справа налево. Интуитивно это понятно.

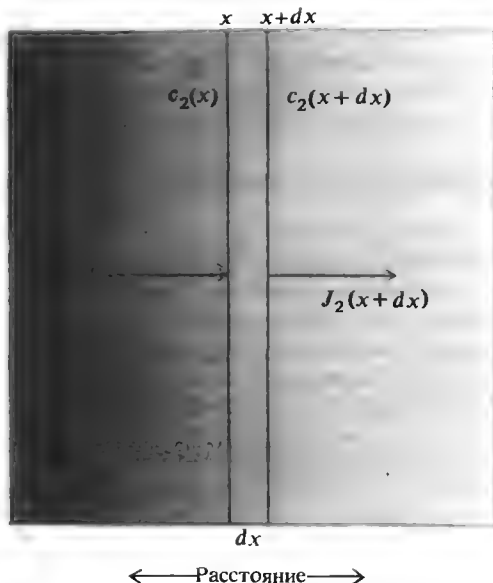


РИС. 10.15. Поток массы через слой жидкости, имеющий градиент концентрации растворенных молекул. Поток J_2 принят положительным для переноса массы слева направо. Толщина слоя равна dx .

В эксперименте часто более удобно измерять не поток вещества, а его концентрацию. В этом случае анализируют изменение концентрации вещества со временем в поле градиента концентрации в тонком слое жидкости dx . Рассмотрим изменение массы растворенного вещества в объеме слоя, ограниченного двумя поверхностями (рис. 10.15). Поток вещества через поверхность x слева направо равен $J(x)$. Поток через поверхность $x + dx$ справа налево равен $-J(x + dx)$. Скорость накопления растворенного вещества в объеме, ограниченном двумя поверхностями x и $x + dx$, равна

$$dm_v/dt = J_2(x) - J_2(x + dx) \quad (10.47)$$

где m_v — масса растворенных в данном объеме макромолекул. Изменение концентрации растворенного вещества c_2 в объеме V равно

$$dc_2/dt = (1/V)(dm_v/dt) = (1/dx)(dm_v/dt) \quad (10.48)$$

где второе равенство следует из того, что толщина слоя равна dx , а поверхность равна единице. Из последних двух уравнений для предельно тонкого слоя dx получаем

$$(dc_2/dt)_x = [J_2(x) - J_2(x + dx)]/dx = -(\partial J_2/\partial x)_t \quad (10.49)$$

Уравнение (10.49) является основным для всех гидродинамических исследований, оно справедливо независимо от вида сил или градиентов, действующих на систему. Это уравнение просто выражает закон сохранения массы. Если входящий в объем поток не равен выходящему, то концентрация растворенного вещества в элементе объема должна быть функцией времени. Объединение уравнений (10.45) и (10.49) приводит к выражению, которое носит название второго закона диффузии Фика

$$(dc_2/dt)_x = -\partial(-D\partial c_2/\partial x)/\partial x = D(\partial^2 c_2/\partial x^2) \quad (10.50)$$

Следует отметить, что второе равенство уравнения (10.50) справедливо только для предельно низких концентраций. Как будет показано ниже, коэффициент диффузии D зависит от трения макромолекул в растворе. Сила трения зависит от концентрации, и если концентрация раствора является функцией x , то величина D тоже должна меняться. Из уравнения (10.50) следует, что D измеряется в $\text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$. Из размерности коэффициента диф-

фузии следует, что расстояние, проходимое молекулой при диффузии, пропорционально $\sqrt{Dt}$. Такая зависимость от времени обусловлена беспорядочным блужданием частиц растворенного вещества при диффузии. В гл. 18 при обсуждении конформации полимерных цепей мы встретимся с другими примерами такого же поведения частиц.

РЕШЕНИЯ УРАВНЕНИЙ ФИКА

Решение уравнения (10.50) дает значение концентрации макромолекул в растворе в любой точке образца как функцию времени $c_2(x, t)$. Для решения этого уравнения необходимо определить граничные условия. Для случая свободной диффузии, процесс которой представлен схематически на рис. 10.14, граничными условиями являются $c_2(x, 0) = c_0$ при $x < 0$ и $c_2(x, 0) = 0$ при $x > 0$. Для решения таких уравнений существует мощный математический аппарат, использующий метод фурье-преобразования (один из примеров решения приведен в Дополнении 10.3). Здесь же достаточно привести менее изящное решение.

Поскольку мы хотим выразить решение уравнения (10.50), $c_2(x, t)$, через коэффициент диффузии D , размерность которого выражена в единицах x^2/t , будем считать, что c_2 является функцией x^2/t . Введем переменную $y^2 = x^2/t$ и сделаем замену переменных в уравнении (10.50):

$$\frac{\partial c_2}{\partial t} = \left(\frac{\partial c_2}{\partial y} \right)_x \frac{\partial y}{\partial t} = -\frac{x}{2t^{3/2}} \left(\frac{\partial c_2}{\partial y} \right)_x = -\frac{y}{2t} \left(\frac{\partial c_2}{\partial y} \right)_x \quad (10.51)$$

$$\frac{\partial c_2}{\partial x} = \left(\frac{\partial c_2}{\partial y} \right)_t \frac{\partial y}{\partial x} = \frac{1}{t^{1/2}} \left(\frac{\partial c_2}{\partial y} \right)_t \quad (10.52)$$

$$\frac{\partial^2 c_2}{\partial x^2} = \left(\frac{\partial}{\partial x} \right)_t \frac{1}{t^{1/2}} \left(\frac{\partial c_2}{\partial y} \right)_t = \left(\frac{\partial}{\partial y} \right)_t \left(\frac{\partial y}{\partial x} \right)_t \frac{1}{t^{1/2}} \left(\frac{\partial c_2}{\partial y} \right)_t = \frac{1}{t} \left(\frac{\partial^2 c_2}{\partial y^2} \right)_t \quad (10.53)$$

В результате исходное выражение второго закона Фика выглядит следующим образом:

$$-(y/2)(\partial c_2/\partial y)_x = D(\partial^2 c_2/\partial y^2)_t \quad (10.54)$$

Это обычное дифференциальное уравнение второго порядка. Интегрирование его приводит к выражению

$$dc_2/dy = (1/k)e^{-y^2/4D} \quad (10.55)$$

где постоянная интегрирования k определяется из граничных условий. Возвращаясь к переменным x и t , получаем

$$(\partial c_2/\partial x)_t = (1/kt^{1/2})e^{-x^2/4Dt} \quad (10.56)$$

Можно интегрировать это выражение от $x = -\infty$ до $x = +\infty$, полагая, что у достаточно протяженного образца концентрации сверху (0) и у дна (c_0) остаются все время постоянными и равными исходным:

$$\int_{c_0}^0 dc_2 = -c_0 = -(1/kt^{1/2}) \int_{-\infty}^{\infty} e^{-x^2/4Dt} dx = -\sqrt{4\pi Dt}/kt^{1/2} \quad (10.57)$$

Результат интегрирования позволяет определить величину k . Подставив ее в выражение (10.56), получим

Дополнение 10.3

РЕШЕНИЕ УРАВНЕНИЯ ВТОРОГО ЗАКОНА ФИКА МЕТОДОМ ФУРЬЕ-ПРЕОБРАЗОВАНИЯ

Второй набор граничных условий для процесса диффузии относится к случаю, когда в начальный момент имеется тонкий слой растворенного вещества. Это может быть зона образца при любом методе разделения, например при гель-хроматографии вещества (гл. 12) или его седиментации (гл. 11). В отсутствие каких-либо внешних сил слой размывается вследствие диффузии. Если в начальный момент слой растворенного вещества занимает положение $x = 0$ и содержит W_0 граммов растворенного вещества, то в момент времени $t = 0$ граничным условием является $c_2(x, 0) = W_0 \delta(0)$, где $\delta(0)$ — дельта-функция Дирака, значение которой равно бесконечности, когда аргумент равен нулю, и нулю во всей остальной области значений аргумента (см. Дополнение 13.3). Уравнение диффузии для слоя с такими граничными условиями решают прямым способом, используя метод Фурье-преобразования. Применяя оператор Фурье $\int_{-\infty}^{\infty} e^{ikx} dx$ к обеим частям уравнения (10.50), получаем

$$\frac{d}{dt} \int_{-\infty}^{\infty} e^{ikx} c_2(x, t) dx = D \int_{-\infty}^{\infty} e^{ikx} \frac{d^2}{dx^2} c_2(x, t) dx \quad (A)$$

Проинтегрируем член $d^2 c_2 / dx^2$ по частям дважды. Правая часть уравнения А приобретает вид

$$D e^{ikx} dc_2/dx \Big|_{-\infty}^{\infty} - (i/k) D e^{ikx} c_2 \Big|_{-\infty}^{\infty} - k^2 D \int_{-\infty}^{\infty} e^{ikx} c_2 dx$$

Так как $c_2(\pm \infty, t)$ и $(dc_2/dx)(\pm \infty, t)$ равны 0 для любого момента времени, первые два члена равны нулю. Таким образом, уравнение А упрощается и принимает вид

$$d\bar{c}_2(k, t)/dt = -k^2 D \bar{c}_2(k, t), \text{ где}$$

$$\bar{c}_2(k, t) = \int_{-\infty}^{\infty} e^{ikx} c_2(x, t) dx$$

представляет собой не что иное, как преобразование Фурье члена $c_2(x, t)$ (см. Дополнение 13.2). Решение этого простого уравнения первого порядка выглядит следующим образом:

$$\bar{c}_2(k, t) = \bar{c}_2(k, 0) e^{-k^2 D t}$$

Из исходного граничного условия следует

$$\bar{c}_2(k, 0) = \int_{-\infty}^{\infty} e^{ikx} c_2(x, 0) dx = \int_{-\infty}^{\infty} e^{ikx} dx W_0 \delta(0) = W_0$$

Для того чтобы представить концентрацию как функцию x и t , мы должны применить обратный оператор Фурье $(1/2\pi) \int_{-\infty}^{\infty} e^{-ikx} dk$ к члену $\bar{c}_2(k, t)$:

$$c_2(x, t) = (1/2\pi) \int_{-\infty}^{\infty} e^{-ikx} W_0 e^{-k^2 D t} dk$$

Заменой переменных $y = k\sqrt{Dt} + ix/\sqrt{4Dt}$ приходим к выражению

$$c_2(x, t) = (W_0 e^{-x^2/4Dt} / 2\pi\sqrt{Dt}) \int_{-\infty + ix/\sqrt{4Dt}}^{\infty + ix/\sqrt{4Dt}} e^{-y^2} dy$$

Теперь этот интеграл по комплексной плоскости можно взять обычными методами. Впрочем, оказывается, что величина его такая же, как и у вещественного интеграла

$$\int_{-\infty}^{\infty} e^{-z^2} dz = \sqrt{\pi}, \text{ поэтому} \\ c_2(x, t) = W_0 e^{-x^2/4Dt} / \sqrt{4\pi Dt} \quad (\text{Б})$$

Как видно из уравнения (Б), форма первоначально тонкого слоя становится гауссовой. По мере протекания диффузии толщина слоя увеличивается пропорционально $\sqrt{4Dt}$. Этот важный вывод следует иметь в виду при разделении различных веществ. Используя последнюю зависимость, можно определить коэффициент диффузии исходя из толщины слоя.

$$(\partial c_2 / \partial x)_t = -(c_0 / \sqrt{4\pi Dt}) e^{-x^2/4Dt} \quad (10.58)$$

Из соображений симметрии концентрация в точке $x = 0$, или $c_2(0, t)$, постоянно равна $c_0/2$. Уравнение (10.58) можно проинтегрировать еще раз в пределах от $x = 0$ до x с учетом этого граничного условия. Для интегрирования введем переменную $v^2 = x^2/4Dt$, что позволяет в окончательном виде получить

$$c_2(x, t) = (c_0/2) \left[1 - (2/\sqrt{\pi}) \int_0^{x/\sqrt{4Dt}} e^{-v^2} dv \right] \quad \text{для } x > 0, t > 0 \quad (10.59)$$

Интеграл в уравнении (10.59) нельзя выразить в аналитической форме. Он называется интегралом вероятности, его численные значения приведены во многих справочниках.

ИЗМЕРЕНИЕ ДИФфуЗИИ

Существует много способов измерения как концентрации растворенного вещества c_2 , так и градиента концентрации в любой точке образца. Наиболее прямым методом является измерение распределения по образцу оптической плотности, или поглощения света, в разные моменты времени. Концентрация определяется по закону Ламберта—Бэра. Если по тем или иным причинам нельзя измерить поглощение света образцом, то распределение концентрации по кювете можно получить с помощью рэлеевского интерферометра, измеряющего разности коэффициентов преломления. Это дает возможность представить кривую распределения концентрации по образцу. И наконец, с помощью шпирен-оптики непосредственно измеряется градиент показателя преломления, откуда прямо находят dc_2/dx . Последние два оптических метода весьма изящны, но сложны. Интересующийся читатель может обратиться к специальным источникам, в которых подробно описаны принципы этих методов и их практическое применение (Van Holde, 1971; Freifelder, 1976). После измерения c_2 или dc_2/dt с помощью целого ряда численных или графических способов определяют величину D из уравнения (10.58) или (10.59).

Несмотря на простоту теории метода свободной диффузии, практическое применение его связано с большими экспериментальными трудностями. Константы диффузии высокомолекулярных веществ имеют порядок от 10^{-7} до 10^{-6} см²·с⁻¹. Удалось оценить (см. выражение Б в Дополнении 10.3) время размытия исходной тонкой границы до толщины 1 мм, которое составляет несколько часов. Чтобы точно измерить время размытия, нужно создать границу толщиной много меньше 1 мм, что само по себе представляет значительную трудность. Для размытия границы до 1 см потребуются сотни часов. Такое диффузион-

ное размытие уменьшает требования к начальной толщине границы, но длительность проведения эксперимента в свою очередь создает другие затруднения. Эти рассуждения справедливы по отношению к начальным условиям для ступенчатой функции, представленной на рис. 10.14. Все, что нарушает распределение концентрации в образце за длительное время эксперимента, искажает результаты измерений. Например, из-за колебаний температуры среды в ячейке образуются температурные градиенты, что влечет за собой конвективное перемешивание. Конвективные потоки в этом случае могут перекрывать эффект диффузии. Для предотвращения возникновения температурного градиента необходимо тщательное термостатирование образца с применением специальных механических устройств. Следует, однако, учесть, что любая вибрация этих устройств может вызвать перемешивание жидкости и тем самым также исказить диффузионную картину.

Другая проблема, с которой мы сталкиваемся в экспериментах по определению коэффициентов диффузии, — это гравитационная неустойчивость. В схеме эксперимента, изображенной на рис. 10.14, необходимо, чтобы макромолекулярный раствор находился под более легким растворителем. В противном случае более плотный раствор будет просто «проваливаться» сквозь растворитель, тем самым разрушая горизонтальную границу. В случае тонкой вертикальной границы положение несколько не лучше. Несбалансированное давление, возникающее со стороны зоны большей плотности, немедленно приводит к разрушению границы конвективными потоками. Граница должна быть стабилизирована с помощью градиента плотности, сводящего к минимуму подобные эффекты. Об этом способе стабилизации границы будет сказано более подробно в гл. 11 при обсуждении седиментационных процессов.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ КОЭФФИЦИЕНТА ДИФфуЗИИ С МОЛЕКУЛЯРНОЙ ТОЧКИ ЗРЕНИЯ

При наличии хорошей установки, умело поставив эксперимент, можно исследовать диффузию в двухкомпонентной системе. Из полученных данных, описывающих диффузию с помощью уравнений, выведенных в предыдущем разделе, определяется коэффициент диффузии белка или другой макромолекулы. Здесь мы покажем, как связан этот параметр с характеристиками трения при движении отдельной молекулы растворенного вещества в растворе.

Каждая молекула раствора участвует в броуновском движении. Она либо ускоряется при столкновении с другими молекулами, либо тормозится из-за вязкости раствора. Для количественного описания диффузии необходимо рассмотреть движение каждой молекулы. Скорость отдельной молекулы v_2 в растворе описывается уравнением Ланжевена. Для одномерного случая оно выглядит следующим образом:

$$m_2(dv_2/dt) = -fv_2 + A(t) \quad (10.60)$$

где m_2 — масса частицы, f — коэффициент трения, $A(t)$ — сила, возникающая при столкновении молекул и флуктуирующая случайным образом.

Решение уравнения Ланжевена методами статистической механики позволяет предсказать суммарный перенос массы молекул растворенного вещества. Для этого необходимо провести усреднение движения отдельных молекул. Оно в свою очередь зависит от распределения молекул по энергиям, и, следовательно, можно предвидеть, что конечный результат усреднения является функцией абсолютной температуры образца. Мы не будем приводить здесь решение уравнения Ланжевена. Вместо этого рассмотрим некоторые простые термодинамические соображения, позволяющие определить зависимость между потоком макромолекул раствора через поверхность и коэффициентом трения отдельных молекул.

Представим себе, что все растворенные молекулы движутся через поверхность с одинаковой средней скоростью $\langle v_2 \rangle$. Поток вещества через поверхность равен $J_2 = c_2 \langle v_2 \rangle$.

Каждая отдельная движущаяся таким образом молекула испытывает на себе действие суммарной силы трения $\langle v_2 \rangle f$. Отсюда сила трения, действующая на грамм вещества, равна $N_0 \langle v_2 \rangle f / M_2$, где M_2 — молекулярная масса. Если нет ускорения, то это значит, что сила трения уравновешивается другими равными по величине силами. Ранее было показано, что градиент концентрации является причиной возникновения силы диффузии $(\partial \hat{\mu}_2 / \partial x)_i$, которая вызывает перенос растворенного вещества. В случае свободной диффузии и в отсутствие внешних сил мы можем приравнять эту силу суммарной силе трения:

$$N_0 \langle v_2 \rangle f / M_2 = -(\partial \hat{\mu}_2 / \partial x)_i \quad (10.61)$$

Уравнение (10.61) может быть использовано для определения средней скорости $\langle v_2 \rangle$, величина которой необходима для вычисления обусловленного броуновским движением потока вещества через поверхность. Таким образом,

$$J_2 = c_2 \langle v_2 \rangle = -(c_2 M_2 / N_0 f) (\partial \hat{\mu}_2 / \partial x)_i \quad (10.62)$$

Сравнивая уравнения (10.44) и (10.62), мы найдем, что феноменологический коэффициент L_{22} равен $c_2 M_2 / N_0 f$. Преобразуем уравнение (10.62) так, чтобы его можно было сравнить его с выражениями для закона Фика. Для этого вспомним, что

$$\hat{\mu}_2 = \hat{\mu}_2^0 + (RT / M_2) \ln a_2 = \hat{\mu}_2^0 + (RT / M_2) \ln \hat{\gamma}_2 c_2$$

После подстановки этого выражения в уравнение (10.62) имеем

$$\begin{aligned} J_2 &= -\frac{c_2 M_2 RT}{N_0 f M_2} \left(\frac{\partial (\ln \hat{\gamma}_2)}{\partial x} + \frac{\partial (\ln c_2)}{\partial x} \right) = \\ &= -\frac{c_2 kT}{f} \left(\frac{\partial (\ln \hat{\gamma}_2)}{\partial x} \frac{\partial (\ln c_2)}{\partial (\ln c_2)} + \frac{\partial (\ln c_2)}{\partial x} \right) \end{aligned} \quad (10.63)$$

Вторая строка уравнения (10.63) является преобразованной первой строкой уравнения, в котором первая частная производная просто умножена на $\partial (\ln c_2) / \partial (\ln c_2)$ и отношение R / N_0 заменено постоянной Больцмана по определению. После преобразования частных производных уравнения (10.63) с учетом того, что $\partial (\ln c_2) = c_2^{-1} \partial c_2$, получаем

$$J_2 = -\frac{kT}{f} \left(1 + \frac{\partial (\ln \hat{\gamma}_2)}{\partial (\ln c_2)} \right) \frac{\partial c_2}{\partial x} \quad (10.64)$$

Уравнение (10.64) имеет точно такую же форму, как и первый закон Фика. Сравнивая соответствующие члены этого уравнения с уравнением (10.45), находим, что коэффициент диффузии равен

$$D = (kT / f) [1 + \partial (\ln \hat{\gamma}_2) / \partial (\ln c_2)] \quad (10.65)$$

При бесконечном разбавлении коэффициент активности $\hat{\gamma}_2$ равен 1, $\partial (\ln \hat{\gamma}_2) / \partial (\ln c_2) = 0$ и выражение для коэффициента диффузии D_0 выглядит следующим образом:

$$D_0 = kT / f \quad (10.66)$$

Уравнения (10.65) и (10.66) впервые были выведены Эйнштейном и носят название уравнений Эйнштейна — Сазерленда. Решение уравнения Ланжевена в случае не слишком малых времен диффузии в разбавленном растворе приводит к тому же результату [уравнение (10.65)].

Коэффициент диффузии молекулы должен быть функцией температуры, при которой проводятся измерения. Он зависит также от вязкости растворителя, поскольку эта вели-

Таблица 10.3

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ДИФфуЗИИ¹

Образец	Молекулярная масса	$D_{20,w} \cdot 10^7$, см ² · с ⁻¹	$\bar{V}_2$, см ³ · г ⁻¹	$f/f_{\min}$	Максимально возможная гидра- тация δ_1 , г Н ₂ О · на 1 г белка	Максимально возможное отноше- ние a/b
Глицин	75	93,3	—	—	—	—
Сахароза	342	45,9	—	—	—	—
Панкреатическая рибонук- леаза	13 683	11,9	0,728	1,14	0,35	3,4
Яичный альбумин	14 100	10,4	0,688	1,32	0,89	6,1
Бычий сывороточный аль- бумин	66 500	6,1	0,734	1,31	1,02	6,0
Гемоглобин	68 000	6,9	0,749	1,14	0,36	3,4
Тропомииозин	93 000	2,2	0,71	3,22	23,0	62,0
Фибриноген человека	330 000	1,98	0,706	2,35	8,4	31,0
Миозин	493 000	1,10	0,728	3,65	34,7	80,0
Вирус кустистой карлико- вости	10 700 000	1,15	0,74	1,27	0,78	5,3
Вирус табачной мозаики	40 000 000	0,44	0,73	2,19	6,9	24,0

¹ Данные взяты из разных источников, в том числе из работ Kuntz, Kauzmann, 1974; Tanford, 1961; Van Holde, 1971.

чина входит в закон Стокса. В свою очередь вязкость также является функцией температуры. Вместо того чтобы иметь дело со всеми этими зависимостями, обычно приводят значения измеренных констант диффузии к той величине, которая была бы получена при 20°C в чистой воде:

$$D_{20,w}/D = (293/T)(\eta_{w,T}/\eta_{w,20})(\eta_{p,T}/\eta_{w,T}) \quad (10.67)$$

где $D_{20,w}$ — константа диффузии в чистой воде при 20°C, T — абсолютная температура в опыте, $\eta_{w,20}$ — вязкость чистой воды при 20°C, $\eta_{w,T}$ — вязкость чистой воды при температуре T , $\eta_{p,T}$ — вязкость исследуемого раствора при температуре T .

В табл. 10.3 приведены характерные значения коэффициентов диффузии $D_{20,w}$ для веществ, молекулярные массы которых лежат в интервале величин от меньших чем 10^2 до больших чем 10^7 . По этим данным для коэффициентов диффузии с помощью уравнения (10.66) вычислены поступательные коэффициенты трения. Как видно из таблицы, значения тех и других коэффициентов лежат в более узком интервале, чем молекулярные массы веществ.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ИЗМЕРЕННЫХ ЗНАЧЕНИЙ КОЭФФИЦИЕНТОВ ТРЕНИЯ

Информация, которую мы можем извлечь из измерений коэффициентов трения, зависит от того, как много мы уже знаем о макромолекуле. В общем случае гидратированного эллипсоида вращения

$$f = 6\pi\eta r_{\text{гидр}}F \quad (10.68)$$

где F — фактор формы Перрена [уравнение (10.19)]. Гидратированный радиус $r_{\text{гидр}}$ эквивалентной сферы может быть вычислен с помощью уравнения (10.11):

$$r_{\text{гидр}} = [(3/4\pi)(M/N_0)(\bar{V}_2 + \delta_1 \bar{V}_1)]^{1/3} \quad (10.69)$$

Даже если предположить, что удельный парциальный объем может быть измерен или точно оценен, коэффициент трения в уравнении (10.68) все еще остается функцией трех переменных, а именно аксиального отношения эллипсоида, молекулярной массы и гидратации. В большинстве случаев две величины из трех должны быть измерены независимо, что позволяет вычислить третью. Ранее было показано, что δ_1 можно измерить или оценить с достаточной точностью. Существует много способов определения M , а определив M , можно найти величину f и отсюда вычислить фактор формы Перрена F . Однако, если заранее неизвестно, является ли частица вытянутой или сплюсненной, значение фактора формы не дает непосредственно представления о форме макромолекулы.

Одно и то же значение величины F соответствует многим возможным формам частицы, две из которых являются эллипсоидами вращения. Из табл. 10.2 можно видеть, что неопределенность в описании формы очень велика. В предельном случае, при больших значениях величины F , можно уверенно считать частицу вытянутой, так как дискообразная частица с фактором Перрена, большим чем 1,5, должна иметь ничтожную величину малой полуоси, что нереально. При очень малых значениях F поступательные коэффициенты трения вытянутого и сплюсненного эллипсоидов практически не различаются, хотя, как это видно из рис. 10.9, вытянутый и сплюсненный эллипсоиды (оба с аксиальным отношением 2) являются совершенно различными физическими объектами. Естественно, если форма частицы известна заранее, скажем по данным электронной микроскопии, то коэффициент трения позволяет определить либо молекулярную массу, либо гидратацию, если одна из этих величин определена независимо.

Предположим, что мы знаем только молекулярную массу и парциальный удельный объем, а константу диффузии определили экспериментально. Тогда остаются неизвестными две переменные величины, δ_1 и F . Однозначно их определить нельзя, но можно оценить их предельные значения. Если известна молекулярная масса дегидратированной частицы, то ее минимальный коэффициент трения, соответствующий дегидратированной сфере, равен $f_{\min} = 6\pi\eta r_0$, где $r_0 = (3M\bar{V}_2/4\pi N_0)^{1/3}$. Отношение коэффициента трения, полученного экспериментально, к минимальному коэффициенту трения выразится следующим образом:

$$f/f_{\min} = [(\bar{V}_2 + \delta_1 \bar{V}_1)/\bar{V}_2]^{1/3} F \quad (10.70)$$

Величины F и δ_1 , удовлетворяющие этому трансцендентному уравнению, легко находят графически. Но вероятно, более полезно рассмотреть предельные случаи. Если все избыточное трение возникает за счет гидратации, $F = 1$, а молекула является сферой, то значение максимальной величины гидратации вычисляют из соотношения

$$\delta_1^{\max} = (\bar{V}_2/\bar{V}_1)[(f/f_{\min})^3 - 1] \quad (10.71)$$

Если частица не гидратирована, то аксиальное отношение является максимально возможным. В этом случае аксиальное отношение вытянутого и сплюсненного эллипсоидов находят из таблицы факторов формы Перрена, используя соотношение

$$F_{\max} = f/f_{\min} \quad (10.72)$$

Это в какой-то мере уменьшает неопределенность. Отметим, однако, что величина F , которая определяется из уравнения (10.70), зависит от корня кубического из гидратации, т.е. здесь наблюдается сравнительно слабая зависимость от гидратации. Поэтому часто

для разумной оценки аксиального отношения используют известные значения гидратации. Опыт показал, что для большинства белков гидратация составляет от 0,3 до 0,4 г H_2O /г белка. В табл. 10.3 для ряда белков приведены предельные значения величин гидратации и аксиальных отношений. Позже мы сравним эти величины с данными, полученными другими методами.

Рассмотрим наиболее неблагоприятный случай, когда известны лишь константа диффузии биополимера и удельный парциальный объем. Поскольку минимальная величина $F = 1$, а минимальная величина δ_1 равна 0,0, уравнение (10.69) можно использовать для оценки максимального значения молекулярной массы дегидратированной молекулы. Для большинства веществ молекулярную массу таким образом определяют только с точностью до множителя 2, и поэтому такой подход не представляет интереса.

ДИФфуЗИЯ В МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ СИСТЕМАХ

Как правило, в большинстве случаев растворы макромолекул содержат более чем два компонента. Так, препараты белков или нуклеиновых кислот редко бывают гомогенными. Даже если не учитывать это обстоятельство, следует иметь в виду, что в растворе всегда имеются ионы буфера и другие соли. Для случая трехкомпонентной системы аналог первого закона Фика можно написать, используя уравнение (10.37). Если макромолекула является компонентом 2, а компонентом 3 является другое растворенное вещество, то

$$J_2 = -D_{22}(\partial c_2/\partial x) - D_{23}(\partial c_3/\partial x) \quad (10.73)$$

$$J_3 = -D_{32}(\partial c_2/\partial x) - D_{33}(\partial c_3/\partial x) \quad (10.74)$$

D_{22} и D_{33} — коэффициенты диффузии, которые могут быть определены по данным независимых опытов для двухкомпонентных систем с помощью закона Стокса и уравнения (10.66). Перекрестные члены D_{23} и D_{32} описывают взаимодействие потоков двух компонентов системы. Соотношение Онзагера показывает, что D_{23} и D_{32} связаны простым образом. Обычно для разбавленных растворов величины этих перекрестных членов становятся пренебрежимо малыми. Это является еще одной причиной того, что данные гидродинамических измерений, в том числе и измерений диффузии, должны экстраполироваться к нулевой концентрации растворенных веществ.

Для трехкомпонентных систем характерны электростатические взаимодействия, которые не исчезают при низких концентрациях. Поэтому изучение трехкомпонентных систем требует особого подхода. До сих пор при рассмотрении диффузии не учитывалось, что биологически важные молекулы, как правило, являются заряженными. Вышеприведенные уравнения справедливы для молекул, не имеющих заряда. Только в некоторых предельных случаях они описывают поведение заряженных молекул. Например, ион, движущийся в растворе, содержащем заряженные молекулы, подвергается воздействию локальных электрических полей. В уравнении Ланжевена [уравнение (10.60)] для описания движения заряженной частицы мы должны учесть электростатические взаимодействия

$$m_2(dv_2/dt) = -fv_2 + A(t) + z_2E(t) \quad (10.75)$$

где z_2 — заряд иона, $E(t)$ — зависящее от времени электрическое поле всех других заряженных частиц, находящихся вблизи. Из-за большой величины электростатических сил диффузию иона невозможно рассматривать без учета диффузии противоиона.

Для начала рассмотрим раствор соли, полностью диссоциированной на ионы А и В. Экспериментально определяют константу диффузии соли D , которая связана в соответствии с уравнением (10.66) и законом Стокса с константами диффузии индивидуальных ионов D_A и D_B . Можно показать, что решение уравнения (10.75) приводит к выражению

$$D = q_0^2 D_A D_B / (q_A^2 D_A + q_B^2 D_B), \text{ где} \quad (10.76)$$

$$q_A^2 = (4\pi/\epsilon kT) z_A^2 c_A \quad (10.77a)$$

$$q_B^2 = (4\pi/\epsilon kT) z_B^2 c_B \quad (10.77b)$$

$$q_0^2 = q_A^2 + q_B^2 \quad (10.77b)$$

Здесь ϵ — это диэлектрическая постоянная раствора, z_A и z_B — заряды ионов, а c_A и c_B — их молярные концентрации. Поскольку раствор электронейтрален, $z_A c_A + z_B c_B = 0$. Если соль представляет собою высокомолекулярный полиион с большим зарядом $|z_A|$, а противоион несет единичный заряд $|z_B| = 1$, то условие электронейтральности раствора позволяет в этом случае упростить выражение:

$$D = (1 + z_A^2) D_A D_B / (D_B + z_A^2 D_A) \quad (10.78)$$

Из этого уравнения следует, что если заряд z_A изменяется, то и коэффициент диффузии макромолекулы при постоянных размере и форме должен заметно измениться. Поскольку коэффициент диффузии заряженной макромолекулы D_A много меньше коэффициента диффузии противоиона D_B , полученный в эксперименте коэффициент диффузии макромолекулы D должен быть больше, чем для незаряженной молекулы. В общем случае

$$D_A < D < D_B \quad (10.79)$$

Это приводит к большой неопределенности в значении измеренной величины D в том случае, когда неизвестен заряд макромолекулы. К сожалению, ее заряд обычно неизвестен, хотя имеется потенциальная возможность определить его с помощью электрофореза.

Практически изучение диффузии и других гидродинамических параметров для макромолекул с большим зарядом проводится в присутствии огромного избытка низкомолекулярного электролита. Поскольку система многокомпонентна, анализировать результаты опыта довольно трудно. Важно, что соответствующий заряд всего добавленного электролита эффективно действует как противоион. Таким образом, эффективная концентрация противоионов c_B значительно больше концентрации макромолекул c_A . Из уравнения (10.77) следует, что в этом случае $q_B^2 \gg q_A^2$ и $q_0^2 \cong q_B^2$. Подставляя эти величины в выражение (10.76), получаем $D = D_A$. Таким образом, при достаточно высокой ионной силе

$\left(\sum_i z_i^2 c_i / 2 \right)$ влияние заряда на диффузию исчезает и становятся справедливыми закон Стокса и уравнение (10.66).

Краткие выводы

Метод электронной микроскопии позволяет непосредственно наблюдать размер и форму макромолекул. Для получения контраста между молекулой и пленкой-подложкой образец обрабатывают тяжелыми металлами. Контрастирование сильно ограничивает разрешающую способность. Если образец обладает симметрией вращения или трансляционной симметрией, существующие способы усреднения значительно улучшают качество электронно-микроскопического изображения.

Белки и нуклеиновые кислоты в растворе содержат значительное количество связанной воды; они ведут себя как гидратированные частицы. Движение молекул в растворе изуча-

ют с помощью гидродинамических методов. Эти методы дают сведения о форме и размерах гидратированных макромолекул. Движение молекул в растворе ограничено силами трения, величина которых линейно растет с увеличением скорости частицы. Поступательный коэффициент трения может быть определен методами седиментации и диффузии. Он возрастает пропорционально $M^{1/3}$ и зависит от формы макромолекулы. Коэффициент трения вытянутого эллипсоида несколько больше, чем сплющенного при равных объемах.

Вращательное трение изучают методами поляризованной флуоресценции и двойного лучепреломления в потоке и в электрическом поле. Эллипсоид вращения характеризуется двумя коэффициентами вращательного трения, которые соответствуют вращению вокруг короткой и длинной осей. Особенно чувствителен к форме вращательный коэффициент трения вытянутого эллипсоида при вращении вокруг короткой оси. Вообще трение вращения растет линейно с увеличением молекулярной массы, и поэтому оно более чувствительно к размерам молекулы, чем трение поступательного движения.

Наиболее простым для анализа гидродинамическим методом является метод диффузии, так как единственная сила, действующая на макромолекулы, вызвана пространственным распределением их концентраций. Скорость переноса массы через поверхность пропорциональна градиенту концентрации у этой поверхности. Коэффициент пропорциональности (D) называется коэффициентом диффузии. Коэффициент диффузии обратно пропорционален поступательному коэффициенту трения. Его измеряют по изменению концентрации раствора. Прямое определение D методом свободной диффузии связано со значительными экспериментальными трудностями.

Задачи

10.1. Покажите, что поступательный коэффициент трения димера, состоящего из двух контактирующих друг с другом сферических субъединиц, составляет 80% от его величины для этих же двух субъединиц, но расположенных далеко друг от друга и скрепленных звеном, не обладающим трением.

10.2. Вычислите время релаксации вращения для белка с мол. массой 100 000, считая, что парциальный удельный объем равен $0,74 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$, гидратация составляет $0,3 \text{ г H}_2\text{O} \cdot (\text{г белка})^{-1}$ и белок может быть аппроксимирован вытянутым эллипсоидом с аксиальным отношением 8. [Примечание: лучше использовать данные рис. 10.11, Б, чем уравнение (10.20).]

10.3. Предположим, что тропомиозин является сплюснутым эллипсоидом, гидратация которого составляет $0,3 \text{ г H}_2\text{O} \cdot (\text{г белка})^{-1}$. Вычислите длину короткой оси, используя данные табл. 10.3. Объясните результат, исходя из общих представлений о структуре белка.

10.4. Вычислите общую среднюю скорость диффузии молекул лизоцима (в $\text{см} \cdot \text{с}^{-1}$) в растворе, где концентрация меняется в 2 раза на пути 1 мм (необходимые данные см. в табл. 10.3).

10.5. Предположим, что молекулярная масса дегидратированного белка равна 15 000, а парциальный удельный объем $0,72 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$. Какой максимальный коэффициент диффузии может иметь такой белок? Оцените приблизительно наименьшее значение коэффициента диффузии этого белка, если гидратация составляет $0,4 \text{ г H}_2\text{O} \cdot (\text{г белка})^{-1}$.

ЛИТЕРАТУРА

Общая

Finch J. T., 1975. Electron microscopy of proteins. In: The Proteins, 3rd ed., eds. H. Neurath and R. L. Hill, New York, Academic Press, p. 412.

Kuntz I. D., Jr., Kauzmann W., 1974. Hydration of proteins and polypeptides. In: *Advances in Protein Chemistry*, vol. 28, eds. C. B. Anfinsen, J. T. Edsall and F. M. Richards, New York, Academic Press, p. 239.

Tanford C., 1961. *Physical Chemistry of Macromolecules*, New York, Wiley.

Специальная

Atkins P. W., 1976. *Physical Chemistry*, San Francisco, W. H. Freeman and Company.

Bauer D. R., Brauman J. I., Pecora R., 1974. Molecular reorientation in liquids: Experimental tests of hydrodynamic models, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 6840.

Berne B. J., Pecora R., 1975. *Dynamic Light Scattering*, New York, Wiley.

Bloomfield V., Crothers D., Tinoco I., Jr., 1974. *Physical Chemistry of Nucleic Acids*, New York, Harper and Row.

Bloomfield V., Dalton W. O., van Holde K. E., 1967. Frictional coefficients of multisubunit structures, I: Theory, *Biopolymers*, **5**, 135.

Crowther R. A., Klug A., 1975. Structural analysis of macromolecular assemblies by image reconstruction from electron micrographs, *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 161.

Edelstein S. J., Schachman H., 1973. Measurement of partial specific volume by sedimentation equilibrium in H_2O-D_2O solutions. In: *Methods in Enzymology*, vol. 27, eds. L. Grossman and K. Moldave, New York, Academic Press, p. 83.

Eisenberg H., 1976. *Biological Macromolecules and Polyelectrolytes in Solution*, Oxford, Clarendon Press.

Fujita H., 1975. *Foundations of Ultracentrifuge Analysis*, New York, Wiley.

Kratky O., Leopold H., Stabinger H., 1973. The determination of the partial specific volume by a mechanical oscillator technique. In: *Methods in Enzymology*, vol. 27, eds. L. Grossman and K. Moldave, New York, Academic Press, p. 98.

Van Holde K. E., 1971. *Physical Biochemistry*, Englewood Cliffs, N. J., Prentice-Hall.

11.1. Скоростная седиментация

Любая внешняя сила, действующая на взвешенные частицы, может вызвать перенос массы [согласно уравнению (10.37)]. Исследование действия разных сил требует применения весьма различной экспериментальной аппаратуры и при этом выявляются весьма различные аспекты структуры и свойств молекул. В этой главе мы подробно рассмотрим перенос массы, вызванный силой, которая обусловлена радиальным ускорением в ультрацентрифуге. Мы выбрали этот пример, потому что на практике для количественного анализа свойств макромолекул ультрацентрифугирование применяют гораздо охотнее, нежели другие гидродинамические методы.

СЕДИМЕНТАЦИЯ ПОД ДЕЙСТВИЕМ СИЛЫ ТЯЖЕСТИ ИЛИ ЦЕНТРОБЕЖНОЙ СИЛЫ

При определении массы частиц гравитационная сила привлекательна тем, что она действует на всякую частицу. Эта сила зависит только от массы и не зависит от заряда, формы или химического состава частицы. К сожалению, сила земного притяжения очень мала и лишь на самые большие субклеточные биологические структуры (такие, как целые хромосомы в метафазе) оказывает заметное воздействие, достаточное для их высаживания из водного раствора. Классическую седиментацию, обусловленную силой тяжести, используют при определении размеров больших частиц (таких, например, как песчинки); в принципе ее можно даже использовать для разделения живых клеток на основе различий в размерах или плотности.

Если приготовить гомогенную суспензию, состоящую из одинаковых больших частиц, и оставить ее в покое, то частицы осядут на дно сосуда при условии, что их плотность больше плотности растворителя (рис. 11.1). Важно отметить, что при оседании частиц образуется граница, выше которой находится чистый растворитель, а ниже — суспензия с той же весовой концентрацией, что и исходная гомогенная смесь. Это происходит потому, что все частицы находятся под действием одной и той же гравитационной силы и поэтому движутся (в среднем) с одинаковыми скоростями. Таким образом, граница движется со скоростью усредненной седиментирующей частицы. Отметим, что в том случае, когда частицы имеют меньшую, чем у растворителя, плотность, они будут подниматься, а не опускаться — как, например, сливки, которые в конце концов собираются на поверхности цельного молока.

Теперь рассмотрим такой вопрос: почему большие частицы (с большей, чем у воды, плотностью) седиментируют, а плотные, но малые частицы — нет? Как мы увидим ниже, скорость седиментации частицы возрастает с увеличением молекулярной массы, а скорость диффузии при этом падает. В предельном случае больших частиц, таких, как песчинки, седиментация полностью преобладает, и здесь наблюдается очень резкая граница. В предельном случае очень малых частиц почти полностью преобладает диффузия, и никакой границы не образуется. Однако для любых частиц, более плотных, чем растворитель, существует все же отличная от нуля вероятность того, что они окажутся ближе ко дну сосуда, чем к поверхности. Позднее мы вычислим эту вероятность.

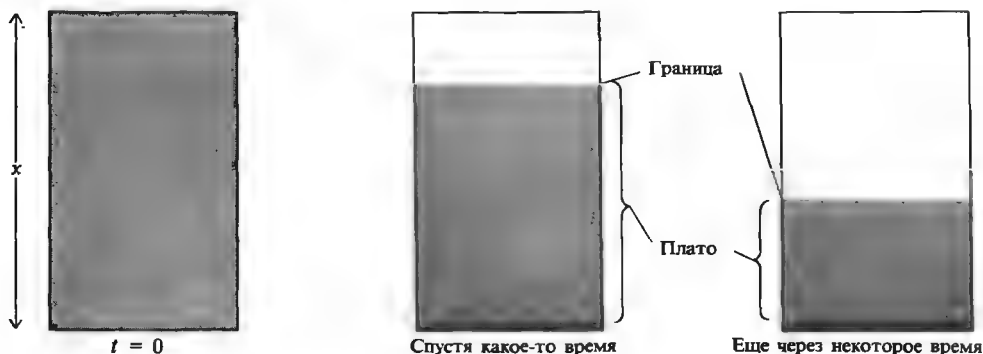


РИС. 11.1. Осаждение песка в сосуде под действием силы тяжести. Предполагается, что в начальный момент времени водная суспензия однородна. Обратите внимание на возникновение с течением времени резкой границы, выше которой находится одна вода, а ниже — песок при той же равномерной концентрации, что и в начале опыта. Вторая резкая граница отмечает верхний уровень песка, образовавшегося осадок на дне.

Для того чтобы происходила заметная седиментация типичных белков или нуклеиновых кислот, нужны силы, значительно превосходящие силу земного притяжения. Такие силы можно получить, поместив частицы в ускоряющее поле. В случае линейного ускорения сила определяется простым выражением $F = ma$, однако трудно поддерживать постоянное линейное ускорение в течение длительного времени. Логической альтернативой является центробежное ускорение. Радиальная сила, возникающая при вращении предмета, имеющего массу m , равна

$$F = m\omega^2 r \quad (11.1)$$

где r — расстояние от центра вращения, а ω — угловая скорость, которая измеряется в радианах в секунду. На массу в 1 г, которая вращается со скоростью 60 000 об/мин, при радиусе вращения 10 см действует сила $3,95 \cdot 10^8$ дин. Это более чем в 400 000 раз превосходит силу тяжести (равную 980 дин у поверхности Земли). Может показаться, что это очень большая сила, однако ее недостаточно для того, чтобы можно было пренебречь диффузией для большей части белков и нуклеиновых кислот. При описании движения макромолекул в ультрацентрифуге мы должны рассматривать его как результат одновременно протекающих процессов седиментации и диффузии.

УЛЬТРАЦЕНТРИФУГА

При конструировании ультрацентрифуг — приборов, в которых исследуемый раствор вращается со скоростями вплоть до 70 000 об/мин, было проявлено немало изобретательности. На рис. 11.2 дано схематическое изображение аналитической ультрацентрифуги. Образцы находятся в ячейках или пробирках (рис. 11.3) в алюминиевом или титановом роторе, приводимом в движение с помощью электромотора. При обычно используемых скоростях трение между вращающимся ротором и воздухом может вызвать недопустимый разогрев ротора. Поэтому в камере, в которой вращается ротор, необходимо создать высокий вакуум. Чтобы избежать конвекционного перемешивания, температура исследуемого образца должна поддерживаться на постоянном уровне с довольно высокой степенью точности, а это может быть нелегкой задачей. Силы, которые развиваются внутри ротора, — огромны, и случается, что при больших скоростях ротор разлетается

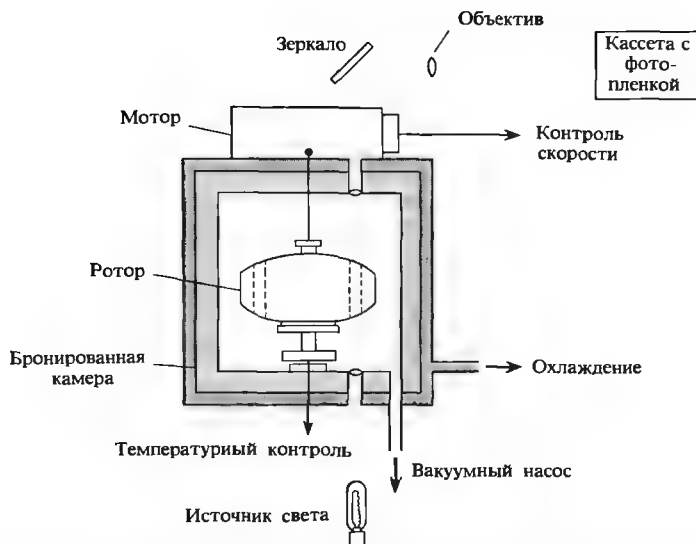


РИС. 11.2. Схематическое изображение современной аналитической ультрацентрифуги. (Freifelder D., 1976, Physical Biochemistry, p. 270. San Francisco, W.H.Freeman and Company.)

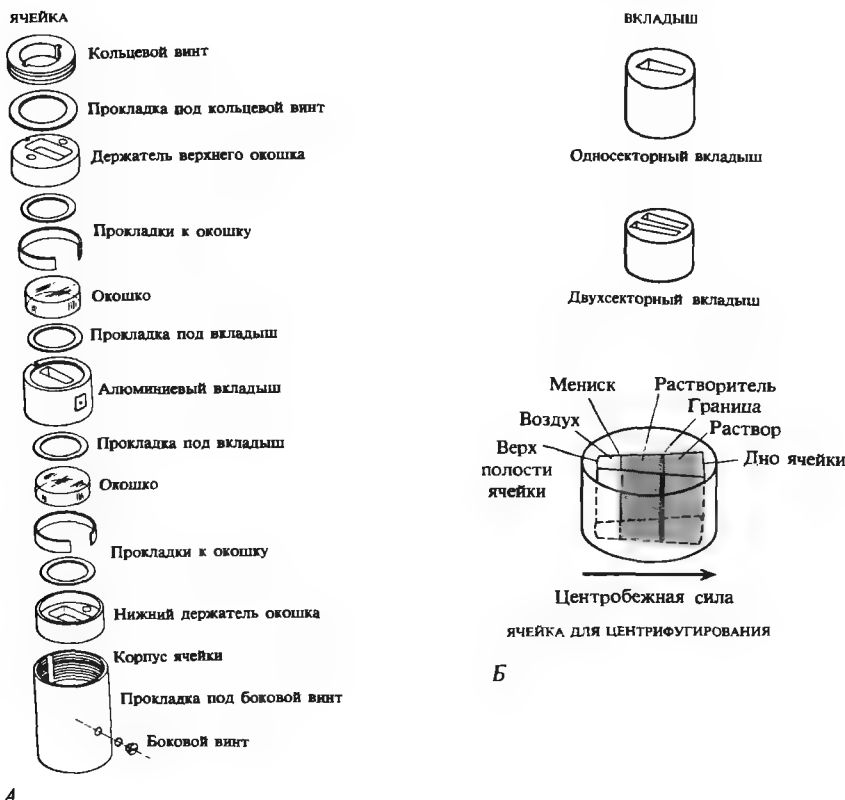


РИС. 11.3. Вкладыши и ячейка для центрифугирования. А. Ячейка в разобранном виде. Б. Вкладыш. (С любезного разрешения фирмы Beckman Instruments.)

на куски. Чтобы эти осколки не разлетелись, камеру с находящимся в ней ротором должны окружать толстые стальные защитные цилиндры.

Крайне важно, чтобы ротор был механически сбалансирован. Допустим, что массы двух ячеек с веществом, расположенных симметрично относительно оси ротора, различаются на 1 мг. При 400 000 г возникающая за счет этого разность сил, действующих на ротор, составит 400 г. Это весьма ощутимая сила, которая приведет к вибрации ротора. Но, как ни важно уравновесить ячейки, это нельзя сделать идеально. Поэтому в любой ультрацентрифуге используется гибкий вал, чтобы ротор мог сам найти точное положение своего центра масс и вращаться вокруг оси, проходящей через этот центр. В случае аналитических роторов это позволяет уравнивать образцы с допуском 0,5 г без нежелательных последствий.

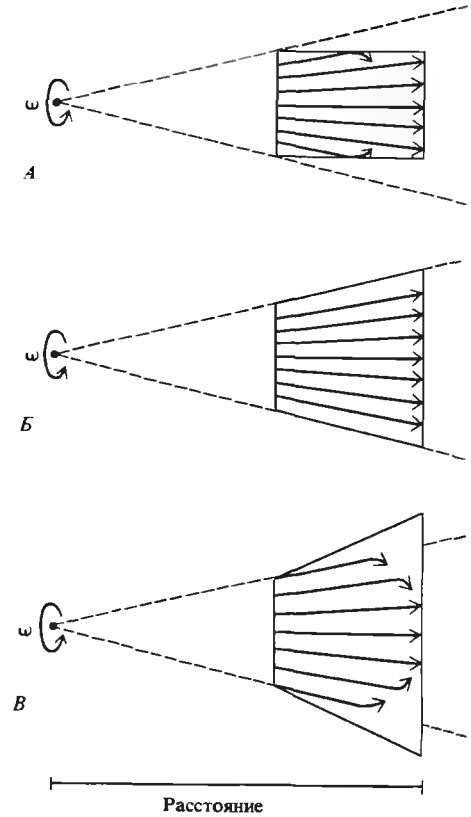
Ультрацентрифугирование может быть препаративным и аналитическим. В качестве препаративного метода оно применяется для очистки препаратов или для разделения смесей с целью последующего анализа. При этом образец, помещенный в цилиндрическую пробирку, вращают с большой скоростью в течение заранее заданного промежутка времени, а затем извлекают из центрифуги, прежде чем приступить к каким-либо измерениям. Преимущество такого подхода состоит в том, что можно использовать большие препаративные объемы (5—100 мл), а также в том, что полученный после центрифугирования образец может быть подвергнут в дальнейшем биохимическим и физическим измерениям. Однако при остановке ротора и извлечении образца неизбежно происходит некоторое взбалтывание или перемешивание содержимого пробирки. К тому же в связи с тем, что в данном случае возможно изучение состояния образца лишь в один из моментов времени, при таком подходе теряется много информации.

При аналитическом ультрацентрифугировании за движением молекул растворенного вещества следят непосредственно во время вращения ротора с находящимся в нем небольшим количеством исследуемого материала (0,1—1 мл). Это обеспечивается оптическими системами, в которых свет проходит через ячейку с веществом параллельно оси вращения. Оптическая система может представлять собой абсорбционную систему, интерференционную систему Рэлея или шлирен-систему — те же три системы, которые упоминались ранее в разделах, посвященных диффузии.

Крайне важным моментом является конструкция ячейки для исследуемого вещества. Такая ячейка должна иметь секториальную форму в сечении, перпендикулярном оси вращения (рис. 11.3, Б). Так как ускоряющая сила — сила радиальная, седиментирующие молекулы движутся вдоль радиусов. Если бы ячейка была прямоугольной (рис. 11.4, А), то траектории многих молекул заканчивались бы соударением с боковыми стенками ячейки. При этом молекулы могут остаться на стенках, но не исключено, что, слипаясь друг с другом, они в конечном счете упадут на дно, вызывая конвекционные токи. В обоих случаях необходимые для описания гидродинамических процессов граничные условия становятся очень сложными. Казалось бы, при той форме ячейки, которая изображена на рис. 11.4, В, не возникает упомянутых проблем, но это не так. Дело в том, что всякое перемещение растворенного вещества должно сопровождаться компенсирующим оттеканием его растворителем. Если макромолекулы седиментируют слева направо, как на рис. 11.4, то растворитель движется справа налево. В случае, который иллюстрирует рис. 11.4, В, молекулы воды ударяются в стенки ячейки и отбрасываются к ее центру, вызывая перемешивание.

Секториальная форма, изображенная на рис. 11.4, Б, позволяет использовать седиментацию для количественных измерений, хотя, как мы скоро увидим, значительно усложняет математическую обработку эксперимента. Ячейками для исследуемого вещества при препаративном ультрацентрифугировании по традиции служат цилиндрические пробирки отнюдь не секториальной формы. Поэтому некоторое количество молекул растворенного вещества теряется на стенках пробирок — эффект, который необходимо учитывать при

РИС. 11.4. Схема переноса растворенного вещества в ячейках различной конфигурации при ультрацентрифугировании. Показана проекция ячеек на плоскость, перпендикулярную оси вращения. А. В прямоугольной ячейке происходит соударение растворенного вещества со стенками. Такая ячейка эквивалентна цилиндрическим пробиркам, используемым в препаративных ультрацентрифугах. Б. В секториальной ячейке, используемой в аналитических ультрацентрифугах, растворенное вещество движется, не встречая препятствий, вдоль радиусов. В. В ячейке, боковые стенки которой расходятся быстрее, чем у секториальной ячейки, растворитель ударяется в стенки, отбрасывая при этом от стенок растворенное вещество.



проведении точной количественной обработки полученных данных. На практике некоторые исследователи забывают вносить необходимые поправки.

ОПИСАНИЕ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕНОСА В УЛЬТРАЦЕНТРИФУГЕ: УРАВНЕНИЕ ЛАММА

На рис. 11.5 дано изображение секториальной ячейки для центрифугирования. На нем обозначены: граница раздела между воздухом и растворителем — x_m (мениск), x_d (дно ячейки), ϕ — угол в вершине сектора и a — толщина ячейки в направлении, параллельном оси вращения. Мы можем рассматривать гидродинамику седиментации как одномерную задачу движения вдоль координаты x , характеризующей расстояние от оси вращения. Поскольку координата x — это радиальное расстояние, она определяет положение цилиндрических поверхностей.

Рассмотрим двухкомпонентную систему, состоящую из растворителя (1) и растворенного вещества (2). Из феноменологического уравнения потока (10.39) следует уравнение для скорости переноса массы растворенного вещества через поверхность в точке x при центрифугировании:

$$J_2 = L_{22}[\omega^2 x - (\partial \hat{\mu}_2 / \partial x)] \quad (11.2)$$

Первый член внутри скобок представляет собой возникающую за счет радиального уско-

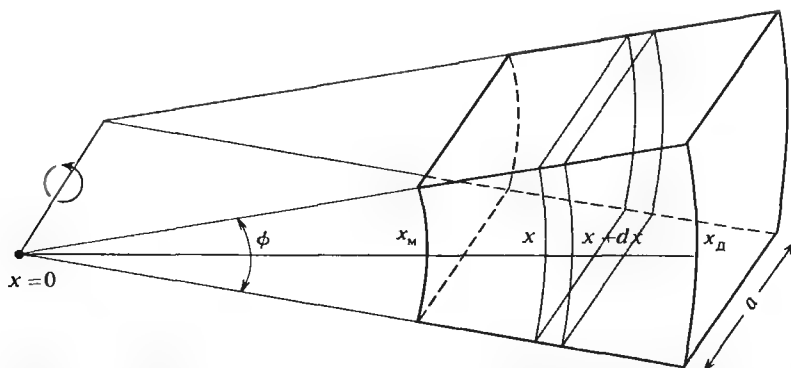


РИС. 11.5. Схема типичной секториальной ячейки для ультрацентрифугирования. x — расстояние от оси вращения; x_m — положение мениска (в действительности x_m соответствует верхней границе раствора, а не реальному физическому верху полости ячейки); x_d — одно ячейки. Ось вращения проходит через $x = 0$. При выводе уравнения Ламма [уравнение (11.7)] рассматривается перенос массы в зоне между x и $x + dx$.

рения силу, действующую на единицу массы макромолекул; второй член описывает диффузионную силу, возникающую при наличии любых градиентов химического потенциала.

Сначала мы воспользуемся механическим описанием седиментационного опыта с тем, чтобы установить, какие параметры мы можем экспериментально измерить. Затем обратимся к термодинамике того же опыта, чтобы связать измеряемые величины с молекулярными параметрами. Внешняя сила, вызывающая перенос массы при центрифугировании, равна $\omega^2 x$ в пересчете на единицу массы. Если нет диффузии, то под действием этой силы происходит упорядоченное движение вещества с постоянной скоростью v в гидродинамически стационарном режиме. Скорость будет зависеть от радиуса и формы седиментирующей частицы, причем она должна быть прямо пропорциональна величине приложенной силы. Введем коэффициент пропорциональности s и назовем его коэффициентом седиментации:

$$s = v/\omega^2 x = (1/\omega^2 x)(dx/dt) \quad (11.3)$$

Согласно уравнению (11.3), s измеряется в секундах. Однако результаты измерений обычно выражают в сведбергах ($1S = 10^{-13} \text{ с}$) — единицах измерения, названных так в честь Сведберга, изобретателя ультрацентрифуги. Следует иметь в виду, что по определению s — это скорость в единичном поле, поэтому любое измеренное значение s не должно зависеть от скорости вращения ротора в ультрацентрифуге.

Мы воспользуемся определением s при описании потока через поверхность радиуса x (рис. 11.5). Из уравнения (11.2) следует, что вклады в поток за счет седиментации и диффузии можно описывать независимым образом. Если концентрацию молекул растворенного вещества в точке x принять равной $c_2 \text{ г/см}^3$ и если все молекулы под действием внешней силы движутся со скоростью $v = \omega^2 x s$, то поток, вызванный угловым ускорением, равен $c_2 \omega^2 x s$. При наличии же в точке x градиента концентрации поток за счет диффузии в этой точке определяется первым законом Фика [уравнение (10.45)]. Таким образом, уравнение (11.2) приобретает вид

$$J_2 = \omega^2 x s c_2 - D(\partial c_2 / \partial x) \quad (11.4)$$

Мы хотим вычислить, насколько изменилась концентрация растворенного вещества в элементе объема, расположенном на расстоянии x от оси вращения. Рассмотрим сначала полный перенос массы через поверхность, проходящую через x . Поскольку J_2 — это по-

ток через единицу площади, полный перенос массы равен $J_2 A$. Площадь A цилиндрической поверхности в ячейке с координатой x равна $ax\phi$. Точно так же, как и ранее при рассмотрении диффузии, мы должны вывести уравнение непрерывности. Полная скорость изменения массы растворенного вещества в объеме, заключенном между поверхностями с координатами x и $x + dx$, равна

$$dm_2/dt = J_2 A(x) - J_2 A(x + dx) \quad (11.5)$$

Изменение концентрации — это изменение массы, поделенное на объем, заключенный между двумя упомянутыми поверхностями:

$$\begin{aligned} dc_2/dt &= (1/\phi xa dx)[J_2 A(x) - J_2 A(x + dx)] = \\ &= (-1/\phi xa) [d(J_2 A)/dx] = -(1/x)[d(xJ_2)/dx] \end{aligned} \quad (11.6)$$

Комбинируя уравнения (11.4) и (11.6), получаем уравнение Ламма:

$$\frac{dc_2}{dt} = \left(\frac{1}{x}\right) \frac{d}{dx} \left[x \left[D \frac{d(c_2 x)}{dx} - c_2 s \omega^2 x \right] \right] \quad (11.7)$$

Это самый общий вид гидродинамического описания переноса массы при центрифугировании для двухкомпонентной системы.

При низкой концентрации растворенного вещества коэффициенты седиментации и диффузии можно считать постоянными. Тогда уравнение (11.7) можно упростить:

$$dc_2 dt = D[(d^2 c_2/dx^2) + (1/x)(dc_2/dx)] - s\omega^2 [x(dc_2/dx) + 2c_2] \quad (11.8)$$

Следует отметить некоторые особенности этого уравнения. Если $\omega^2 = 0$, то уравнение (11.8) просто описывает диффузию. Оно отличается по форме от второго закона Фика [уравнение (10.50)] в связи с тем, что ячейка имеет секториальную форму. Заметим, что при $x = 0$ второй диффузионный член не определен. Это не имеет особого значения, потому что никто никогда не совмещает начало ячейки с осью вращения. Но даже и в этом случае объем, а потому и масса в данной точке были бы равны нулю.

РЕШЕНИЕ УРАВНЕНИЯ ЛАММА ПРИ ПОСТОЯННОМ S И В ОТСУТСТВИЕ ДИФФУЗИИ

Если $D = 0$, то уравнение (11.8) имеет точное решение (Fujita, 1975). Для раствора с равномерной в нулевой момент времени концентрацией c_0 растворенного вещества решение имеет вид

$$c_2(x, t) = 0 \quad \text{если } x_M < x < x \quad (11.9)$$

$$c_2(x, t) = c_0 e^{-2s\omega^2 t} \quad \text{если } x < x < x_D$$

где

$$x = x_M e^{s\omega^2 t} \quad (11.10)$$

Отметим, что накопление материала на дне ячейки при этом не учитывается.

Рис. 11.6, A схематически иллюстрирует полученные результаты. Можно видеть скачкообразное увеличение концентрации растворенного вещества от нуля до некоего уровня, величина которого не зависит от x в любой произвольный момент времени. Скачок происходит в точке x , определяющей положение границы относительно оси вращения. Положение точки x меняется с течением времени, перемещаясь с возрастающей скоростью [что следует из уравнения (11.10)]. Область $x > x$ называют областью плато. Оно остается

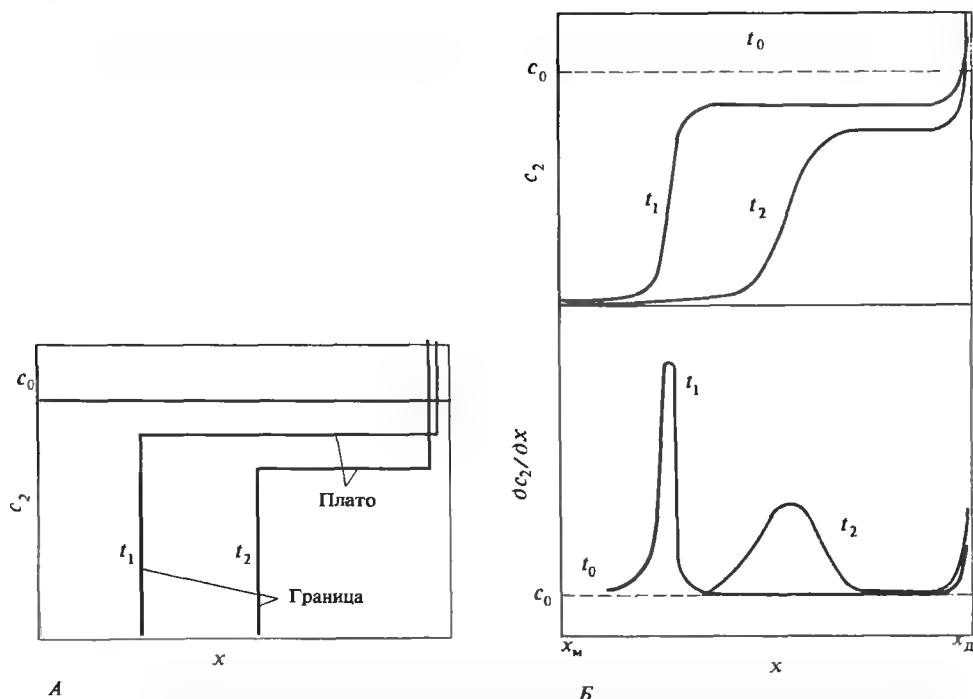


РИС. 11.6. Концентрационные профили растворенного вещества при центрифугировании гомогенного раствора с идентичными макромолекулами. Для большого белка указанные на рисунке моменты времени могут принимать значения $t_0 = 0$ ч, $t_1 = 1$ ч и $t_2 = 2$ ч при 50 000 об/мин. А. Если $D = 0$, то формируется резкая граница, которая смещается с течением времени. За границей следует область постоянной концентрации, или плато; концентрация здесь постепенно уменьшается. Б. Если $D \neq 0$, то диффузия вызывает прогрессирующее во времени уширение границы. Изображен также градиент концентрации (dc_2/dx), регистрируемый с помощью некоторых оптических систем, используемых в ультрацентрифуге.

«горизонтальным» (равномерная концентрация), но мгновенное значение концентрации монотонно убывает с течением времени [что следует из уравнения (11.9)].

Может показаться парадоксальным тот факт, что в ячейке сохраняется область, где концентрация растворенного вещества не зависит от x , уменьшаясь при этом по экспоненте с течением времени. Так происходит потому, что и радиальное ускорение, и площадь поперечного сечения с увеличением x линейно возрастают, и оба эффекта складываются. Рассмотрим тонкий слой раствора в положении $x' > \bar{x}$ в момент времени t_1 . Здесь молекулы седиментируют со скоростью $v' = \omega^2 s x'$. В другом слое в положении $x'' > x'$ (рис. 11.7) молекулы движутся со скоростью $v'' = \omega^2 s x'' > v'$. Этими двумя слоями ограничена некая зона так, как это показано на рисунке. Теперь рассмотрим, какое положение занимают оба края данной зоны в некоторый момент времени t_2 . Молекулы, первоначально находившиеся в x'' , прошли большее расстояние по сравнению с молекулами, которые ранее находились в x' , потому что первые подвергались воздействию большего радиального ускорения в каждый момент времени. Следовательно, ширина зоны со временем увеличивается. Площадь оснований зоны также возрастает из-за секториальной формы ячейки. В результате концентрация растворенного вещества внутри зоны падает, поскольку число

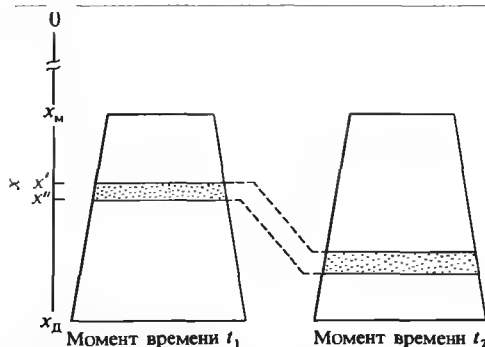


РИС. 11.7. Объяснение радиального разбавления. Изображена зона конечной ширины с одними и теми же молекулами растворенного вещества в ранний и более поздний моменты времени в процессе скоростной седиментации. Каждая точка изображает одну макромолекулу. Площадь зоны возрастает из-за секториальной формы ячейки. Более того, слегка увеличивается толщина зоны, так как молекулы растворенного вещества в нижней ее части (x'') всегда находятся под действием несколько больших ускорений ¹⁾ ($\omega^2 x''$), чем молекулы около ее верхнего основания (x'), где ускорения равны $\omega^2 x'$, так что верхнее и нижнее основания зоны удаляются друг от друга.

молекул растворенного вещества внутри зоны остается неизменным, в то время как объем увеличивается. Этот эффект называют эффектом радиального разбавления.

Для того чтобы доказать существование плато, мы должны показать, что во всех зонах происходит одинаковое радиальное разбавление. Для этого достаточно доказать, что относительное изменение объема зоны не зависит от ее положения. Объем V зоны равен толщине зоны ($x'' - x'$), умноженной на ее площадь. Площадь равна среднему арифметическому по двум основаниям: $\frac{1}{2} (\phi x' a + \phi x'' a)$. Таким образом,

$$V = \frac{1}{2} \phi a [(x'')^2 - (x')^2] \quad (11.11)$$

Скорость x' -поверхности зоны равна

$$v' = dx'/dt = \omega^2 s x' \quad (11.12)$$

Для поверхности, которая ранее (в момент времени t_1) находилась в $x'(t_1)$, решение этого простого дифференциального уравнения для момента времени t_2 имеет вид

$$x'(t_2) = x'(t_1) e^{\omega^2 s (t_2 - t_1)} \quad (11.13)$$

Аналогичным образом для поверхности, первоначально расположенной в $x''(t_1)$, получаем

$$x''(t_2) = x''(t_1) e^{\omega^2 s (t_2 - t_1)} \quad (11.14)$$

Отношение объемов зоны соответственно в моменты времени t_2 и t_1 равно

$$\begin{aligned} V(t_2)/V(t_1) &= \{[x''(t_2)]^2 - [x'(t_2)]^2\} / \{[x''(t_1)]^2 - [x'(t_1)]^2\} = \\ &= e^{2\omega^2 s (t_2 - t_1)} \end{aligned} \quad (11.15)$$

Это отношение объемов не зависит от x . Таким образом, поскольку число молекул в любой зоне не меняется, а кратность увеличения объема любой зоны одна и та же, концентрации во всех зонах должны быть одинаковыми. Отметим, что мы фактически вновь вывели уравнения (11.9) и (11.10). Положим $t_1 = 0$ в уравнениях (11.13) и (11.15), и пусть $x'(0)$

¹⁾ Авторы, естественно, имеют в виду поле центробежных сил, а не ускорение частицы. — Прим. ред.

совпадает с верхом полости ячейки (x_m). Тогда уравнение (11.13) совпадает с уравнением (11.10). Если исходная концентрация в момент времени $t = 0$ равна c_0 , то уравнение (11.15) показывает, что концентрация в области плато в некоторый более поздний момент времени t_2 упадет до значения $c_0/e^{2\omega^2 s t_2}$, что эквивалентно уравнению (11.9).

РЕШЕНИЕ УРАВНЕНИЯ ЛАММА ДЛЯ БОЛЕЕ РЕАЛИСТИЧЕСКИХ СЛУЧАЕВ

Решение уравнения Ламма в аналитической форме либо численными методами удалось получить лишь для некоторых предельных случаев (Дополнение 11.1). Результаты показывают, что граница и область плато действительно существуют до тех пор, пока влияние седиментационных сил велико по сравнению с влиянием диффузии. В этих более реалистических случаях граница не является предельно резкой, а имеет некоторую ширину, зависящую от D . Здесь также концентрация в области плато постепенно уменьшается (рис. 11.6, Б). Отметим, что диффузионные силы ощутимы лишь вблизи границы, где имеется градиент концентрации. Поэтому даже при наличии диффузии разумно предположить, что плато сохраняется.

Дополнение 11.1

РЕШЕНИЯ УРАВНЕНИЯ ЛАММА

Фуцита (Fujita, 1975) разбирает многочисленные попытки решить уравнение Ламма. Арчибалд получил в 1938 г. точное аналитическое решение уравнения (11.8) при постоянных s и D . Однако коэффициенты настолько сложны, что вычисления по формулам Арчибалда даже с помощью численных методов слишком трудоемки и не получили широкого распространения при оценке результатов седиментационных опытов.

Факсén в 1929 г. показал, что решение уравнения (11.8) можно представить в значительно более простом виде для одного частного случая граничных условий. Вместо обычной секториальной ячейки он рассматривал бесконечный сектор: $x_m = 0$ и $x_d = \infty$. Его решение можно использовать для оценки результатов седиментационных опытов в предельном случае начальных моментов времени ($\omega^2 s t \ll 1$) и слабой диффузии ($2D/s\omega^2 x \ll 1$). Полученные Факсеном результаты в общем совпадают с тем, что показано на рис. 11.6, Б. Фуцита в 1956 г. удалось распространить решение Факсэна на случай, когда D — постоянная величина, а s связан с концентрацией зависимостью вида $s = s_0(1 - k_s c)$.

Однако все эти решения настолько громоздки, что экспериментаторы обыкновенно предпочитают пользоваться простыми методами, которые позволяют определить s , если известна концентрация хотя бы в некоторых участках ячейки. В тексте дано подробное описание такого подхода.

Исходя из этого и считая s постоянным, мы можем очень просто решить уравнение (11.8) в области плато. Концентрация растворенного вещества в области плато (c_n) не зависит от x . Поэтому как dc_n/dx , так и d^2c_n/dx^2 равны нулю в любой момент времени, и уравнение (11.8) приобретает вид

$$dc_n/dt = -2c_n s \omega^2 \quad (11.16)$$

Решение этого дифференциального уравнения тривиально, если принять в качестве начального условия условие однородности раствора по всей ячейке с концентрацией макромолекул c_0 в нулевой момент времени:

$$c_n(t) = c_0 e^{-2s\omega^2 t} \quad (11.17)$$

Это выражение совпадает с выражением для $c_2(x, t)$ в (11.9). Таким образом, диффузия не влияет на скорость, с которой уменьшается во времени концентрация в области плато.

Пользуясь уравнением (11.17), мы можем найти коэффициент седиментации s из графика зависимости $\ln c_n$ от t . Прямые измерения концентрации в ультрацентрифуге не всегда, однако, доступны. Шлирен-оптика, например, регистрирует $\partial c_2 / \partial x$, а не c_2 . Альтернативный подход при определении s опирается на уравнение (11.3), которое можно переписать как $s = \omega^2 [d(\ln x) / dt]$. Если бы мы могли следить за какой-нибудь одной частицей в области плато, то из графика зависимости логарифма ее координаты в ячейке от времени можно было бы найти s . В том случае, когда диффузией можно пренебречь, между растворителем и раствором наблюдается резкая граница, а скорости смещения границы и движения частиц в области плато одинаковы. Из уравнения (11.10) находим эту скорость: $dx/dt = s\omega^2 x$, что позволяет определять s по формуле

$$s = \omega^{-2} [d(\ln x) / dt] \quad (11.18)$$

В реальном случае конечная ширина границы означает, что молекулы с разными координатами в области границы движутся с неодинаковыми массовыми скоростями. Отнюдь не очевидно, какую следует взять точку на границе, чтобы ее перемещение соответствовало невозмущенному диффузией движению молекул. Часто берут точку наибольшей крутизны, что соответствует максимальному значению $\partial c_2 / \partial x$. Ее выбирают из-за удобства регистрации, однако это неправильный выбор, хотя, как правило, он приводит лишь к незначительным ошибкам.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЭФФИЦИЕНТА СЕДИМЕНТАЦИИ ПО ПОЛОЖЕНИЮ ГРАНИЦЫ

Нам нужно найти такую точку на границе, которая движется со скоростью, равной скорости смещения x . Тогда можно подставить координату этой точки в уравнение (11.18) и вычислить s . На рис. 11.8 схематически показано, как ее найти. Выберем произвольную точку x_n в области плато. По мере смещения границы общая масса растворенного вещества, заключенная между x_m и x_n , будет уменьшаться. Измеряя $m_{\text{общ}}$, мы узнаем, какое количество растворенного вещества миновало x_n . Эта величина никак не связана с диффузией или с формой границы, поскольку x_n принадлежит плато; $m_{\text{общ}}$ зависит лишь от s , ω^2 , t и c_0 .

Но x по определению соответствует положению границы в таком гипотетическом опыте, где отсутствует диффузия. Чтобы сравнить этот опыт с реальным при том же значении s растворенного вещества, мы должны считать, что величина $m_{\text{общ}}$ в обоих случаях одна и та же. Величина x , удовлетворяющая этому условию, и соответствует в реальном опыте тому расстоянию границы от оси вращения, которое следует брать для вычисления s .

Мы найдем $m_{\text{общ}}$, проинтегрировав произведение концентрации $c_2(x, t)$ на объем $\phi x dx$. Так как в гипотетическом эксперименте концентрация представлена простой ступенчатой функцией, интеграл в этом случае нетрудно вычислить:

$$m_{\text{общ}} = \int_{x_m}^{x_n} a\phi x c_2(x) dx = 0 + c_n \phi a \int_{x_n}^{x_n} x dx = \frac{1}{2} a\phi c_n (x_n^2 - x^2) \quad (11.19)$$

В реальном опыте интеграл

$$m_{\text{общ}} = \int_{x_m}^{x_n} a\phi x c_2(x) dx \quad (11.20)$$

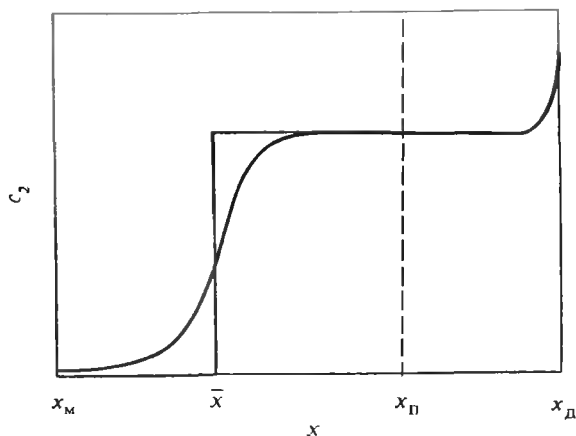


РИС. 11.8. Влияние диффузии на форму седиментирующей границы. Седиментационный профиль реального растворенного вещества (сплошная черная линия) сравнивается с профилем, ожидаемым в том случае, когда вещество седиментирует с той же скоростью, но диффузия отсутствует (линия коричневого цвета). Можно найти такую принадлежащую реальной границе точку x , которая движется с той же скоростью, что и молекулы в области плато. При измерении концентраций в области плато можно взять даже в случае реальной границы любую точку x_{Π} из средней части плато.

невозможно вычислить в общем виде, поскольку у нас нет аналитического представления $c_2(x)$. Его можно, однако, упростить интегрированием по частям:

$$m_{\text{общ}} = a\phi c_2(x)x^2/2 \Big|_{x_M}^{x_{\Pi}} - \frac{1}{2} a\phi \int_{x_M}^{x_{\Pi}} (\partial c_2/\partial x) x^2 dx \quad (11.21)$$

При высокоскоростном центрифугировании $c_2(x_M) = 0$ для любого ненулевого момента времени. Первый член в уравнении (11.21) равен, следовательно, $\frac{1}{2} a\phi c_{\Pi} x_{\Pi}^2$. Приравняв выражения (11.19) и (11.21) друг другу и решив уравнение относительно $\bar{x}$, получим

$$\bar{x}^2 = (1/c_{\Pi}) \int_{x_M}^{x_{\Pi}} (\partial c_2/\partial x) x^2 dx \quad (11.22)$$

Если c_{Π} нельзя непосредственно измерить, ее всегда можно вычислить по формуле:

$$c_{\Pi} = \int_{x_M}^{x_{\Pi}} (\partial c_2/\partial x) dx \quad (11.22a)$$

Таким образом, $\bar{x}^2$ — просто второй момент градиента концентрации. Но $\bar{x}$ не совпадает с положением максимума. Как показывает практика седиментационных измерений, $\bar{x}$ обычно несколько больше того значения x , которое соответствует максимуму $\partial c/\partial x$. Поскольку шпирен-оптика непосредственно регистрирует $\partial c/\partial x$, $\bar{x}$ нетрудно вычислить, и из графика зависимости $\ln \bar{x}$ от времени можно получить правильное значение коэффициента седиментации.

Уравнения (11.16) и (11.18) дают два независимых значения коэффициента седиментации: одно значение получено фактически в области границы, а другое — в области плато. Эти величины должны совпадать, и мы можем, следовательно, записать:

$$s = (d\bar{x}/dt)/\omega^2 \bar{x} = -(1/2\omega^2 c_{\Pi})(dc_{\Pi}/dt) \quad (11.23)$$

По мере того как граница движется от x_M к $\bar{x}$, концентрация в области плато уменьшается от c_0 до c_n , так что

$$\int_{x_M}^{\bar{x}} d(\ln x) = -\frac{1}{2} \int_{c_0}^{c_n} d(\ln c_n) \quad (11.24)$$

После интегрирования и преобразований получаем простое соотношение, описывающее радиальное разбавление:

$$c_n/c_0 = (x_M/\bar{x})^2 \quad (11.25)$$

В принципе форма границы со всеми ее особенностями содержит информацию о коэффициенте диффузии седиментирующих частиц (Dishon et al., 1967); она отражает также наличие в исследуемом материале полидисперсности любого рода (Schachman, 1959). На практике зачастую бывает трудно выделить полезную информацию, поскольку любые эффекты, связанные с влиянием концентрации на s или D , сказываются очень сильно в области границы. Прежде чем приступить к обсуждению этих эффектов, полезно выяснить, как связан s со свойствами седиментирующих макромолекул. Мы попытаемся сделать это с помощью несложных рассуждений из области механики.

11.2. Анализ результатов седиментационных измерений

УРАВНЕНИЕ СВЕДБЕРГА

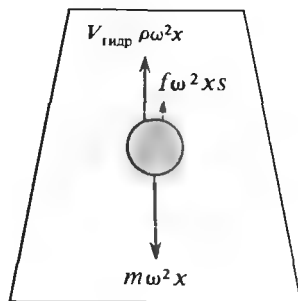
Выведем сначала на основе законов механики соотношение, связывающее s с молекулярными параметрами. Во время центрифугирования на гидратированную макромолекулу, находящуюся в области плато, действуют три силы (рис. 11.9). Пусть M — масса молекулы в безводной форме, а δ_1 — степень гидратации (в г/г); тогда суммарная ускоряющая сила F_y , действующая на одну частицу, равна $(M/N_0)(1 + \delta_1)\omega^2x$. Эта сила уравновешивается двумя другими силами. Одна из них — сила сопротивления за счет трения — имеет простой вид: $F_{тр} = -f\omega^2x$. Другая — это выталкивающая сила (архимедова), которая прямо пропорциональна массе m_p раствора, вытесненного макромолекулой: $F_A = -m_p\omega^2x$. Вытесненный раствор занимает объем, равный объему $V_{гидр}$ гидратированной макромолекулы; его можно вычислить с помощью уравнения (10.11). Если плотность раствора равна ρ , то

$$F_A = -V_{гидр}\rho\omega^2x = (M/N_0)(V_2 + \delta_1\bar{V}_1)\rho\omega^2x \quad (11.26)$$

В гидродинамически стационарном режиме сумма всех сил равна нулю:

$$(M/N_0)(1 + \delta_1 - \bar{V}_2\rho - \delta_1\bar{V}_1\rho) = sf \quad (11.27)$$

РИС. 11.9. Силы, действующие на макромолекулу при ультрацентрифугировании. Молекула движется с постоянной скоростью ω^2x . Ускоряющая сила $m\omega^2x$ уравновешивается суммой сил, направленных в противоположную сторону: силы трения и выталкивающей силы. Отметим, что для типичных белков сила трения $f\omega^2x$ составляет около одной трети величины выталкивающей силы $V_{гидр}\rho\omega^2x$.



В разбавленных растворах $\rho^{-1} \cong \bar{V}_1$, поэтому второй и четвертый члены в левой части уравнения (11.27) сокращаются, после чего получаем

$$s = M(1 - \bar{V}_2\rho) N_0 f \quad (11.28)$$

Использованный здесь вывод, хотя и полезен для понимания механики процесса, не может считаться корректным из-за того допущения, которым мы пользовались при переходе от уравнения (11.27) к уравнению (11.28), а также потому, что в выражение для выталкивающей силы мы ввели плотность раствора без достаточного на то основания. Однако получившийся в конечном счете коэффициент поправки на плавучесть $1 - \bar{V}_2\rho$ правилен, и это приводит к некоторым интересным следствиям. Предположим, что $\bar{V}_2 > \rho^{-1}$. Это верно, например, в случае липидсодержащих препаратов в водном растворе. Поскольку коэффициент $1 - \bar{V}_2\rho$ в этом случае будет отрицательным, при центрифугировании липиды будут всплывать по направлению к мениску, а не осаждаться на дно.

Более строгий вывод уравнения (11.28) следует начать с термодинамического описания потока в двухкомпонентной системе [уравнение (11.2)]. Влияние трения — единственный фактор, связывающий поток с силами, возникающими при седиментации и диффузии. Феноменологический коэффициент должен быть таким же, как в случае чистой диффузии в уравнении (10.61), так что $L_{22} = M_2 c_2 / N_0 f$. Поэтому мы можем записать для потока:

$$J_2 = (M_2 c_2 / N_0 f) [\omega^2 x - (\partial \hat{\mu}_2 / \partial x)] \quad (11.29)$$

В опыте с ультрацентрифугированием при постоянной температуре из переменных термодинамических величин, способных повлиять на μ_2 , остаются давление (P) и концентрация (c_2). Учитывая отдельно влияние каждой из этих величин, получим

$$\partial \hat{\mu}_2 / \partial x = (\partial \hat{\mu}_2 / \partial P)_T (\partial P / \partial x) + (\partial \hat{\mu}_2 / \partial c_2)_T (\partial c_2 / \partial x) \quad (11.30)$$

Градиент давления в растворе на расстоянии x от оси вращения составляет $\omega^2 x \rho$, где ρ — плотность раствора в точке x , а $\omega^2 x$ — ускоряющее поле. Множитель $\partial \hat{\mu}_2 / \partial P$ — это, согласно определению, парциальный удельный объем, т.е. просто $\bar{V}_2$. Второй член в уравнении (11.30) мы вычисляли, когда рассматривали диффузию; для идеального раствора он равен $(RT/M_2 c_2)(\partial c_2 / \partial x)$. [См. уравнения (10.41) — (10.45).] Итак, уравнение (11.29) приобретает вид

$$\begin{aligned} J_2 &= (M_2 c_2 / N_0 f) [\omega^2 x - \bar{V}_2 \rho \omega^2 x - (RT/M_2 c_2)(\partial c_2 / \partial x)] = \\ &= [M_2(1 - \bar{V}_2 \rho) / N_0 f] c_2 \omega^2 x - (kT/f)(\partial c_2 / \partial x) \end{aligned} \quad (11.31)$$

При сравнении этого выражения с механическим описанием потока [уравнение (11.4)] становится очевидно, что

$$s = M(1 - \bar{V}_2 \rho) N_0 f \quad \text{и} \quad D = kT/f \quad (11.32)$$

где мы опустили индекс 2 при символе молекулярной массы растворенного вещества.

Из уравнения (11.28) или (11.32) следует, что коэффициент седиментации зависит как от молекулярной массы безводного вещества, так и от коэффициента трения. В двухкомпонентной системе самостоятельное значение имеет лишь безводная форма молекулярной массы, поскольку любой прирост ускоряющей силы за счет дополнительной массы связанной воды полностью компенсируется увеличением выталкивающей силы. В многокомпонентной системе ситуация сложнее. Там J_2 зависит не только от сил, действующих на компонент 2, но и от сил, действующих на третий компонент: $J_2 = L_{22} X_2 + L_{23} X_3$. К тому же $\hat{\mu}_2$ зависит от концентрации третьего компонента (c_3). Так что в уравнении (11.30)

появляется дополнительный член $(\hat{\partial}\mu_2/\partial c_3)(\partial c_3/\partial x)$. Эффекты, связанные с трехкомпонентностью системы, могут быть значительны в том случае, когда седиментация проводится в концентрированных солевых растворах. Эти эффекты мы обсудим ниже при рассмотрении центрифугирования в градиенте плотности. (См. также Дополнение 11.3.)

При выводе уравнения (11.29) мы предполагали, что коэффициенты трения при диффузии и седиментации одинаковы. Однако это справедливо далеко не всегда, особенно если мы хотим сравнить коэффициенты трения, измеренные в разных условиях: f_D (при пассивных процессах диффузии) и f_s (при наличии больших сил во время центрифугирования). Например, у гибкой молекулы, которая седиментирует под действием сил, в сотни тысяч раз превосходящих силу земного притяжения, может измениться форма, а следовательно, и коэффициент трения. Такие осложнения, однако, редки. Обычно можно не опасаться и объединять выражения в уравнениях (11.32), исключая при этом коэффициент трения. В результате получаем уравнение Сведберга

$$M = sRT'D(1 - \bar{V}_2\rho) \quad (11.33)$$

Заметим, что в этом уравнении R измеряется в единицах СГС: $R = N_0k = 8,31 \cdot 10^7$ эрг/(моль · град).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС ПО ДАННЫМ СЕДИМЕНТАЦИОННЫХ ИЗМЕРЕНИЙ

Уравнение Сведберга позволяет однозначно определить молекулярную массу независимо от того, какую форму имеют молекулы, если удастся выполнить независимые измерения коэффициента седиментации, коэффициента диффузии и парциального удельного объема на равноценных препаратах в приблизительно одинаковых условиях. На практике условия, в которых проводят измерения этих трех видов, редко бывают идентичными. Обычно результаты седиментационных измерений приводят к значениям, которые получились бы, если бы эти измерения проводили при 20°C в чистой воде.

Поправки для случая диффузии дает уравнение (10.67). Соответствующие поправки для седиментации получают, учитывая [см. уравнение (11.32)], что s зависит от растворителя и температуры (поскольку $\bar{V}_2$ и ρ зависят от этих параметров) и от вязкости η [поскольку f зависит от вязкости; см. уравнение (10.68)]. Таким образом, отношение коэффициента седиментации, измеренного в воде при 20°C, к соответствующему коэффициенту, измеренному в других условиях, имеет вид

$$\frac{s_{20,w}}{s} = \frac{1 - 0,9982(\bar{V}_2)_{20,w}}{1 - \bar{V}_2\rho} \left(\frac{\eta_{T,w}}{\eta_{20,w}} \right) \left(\frac{\eta_{T,p}}{\eta_{T,w}} \right) \quad (11.34)$$

где индексы p и T относятся соответственно к рассматриваемому раствору с исследуемым веществом и температуре во время опыта; $\eta_{T,w}$ — вязкость чистой воды при температуре T ; $\eta_{20,w} = 0,01002$ П; $0,9982$ г/см³ — плотность воды при 20°C; $(\bar{V}_2)_{20,w}$ — парциальный удельный объем, измеренный в воде при 20°C¹⁾.

¹⁾ Следует, однако иметь в виду, что часть соединений вообще не может существовать в водных растворах, а тем более в «чистой» воде. Многие макромолекулы и биологические структуры, например, агрегируют и выпадают в осадок, разваливаются на составные части, как вирусы при лизисе. Во всех этих случаях они превращаются фактически в другое вещество, к которому и будет относиться измеренная величина $V_{20,w}$. Поэтому многие исследователи часто, например в случае ДНК, учитывали только температурную зависимость V , заменяя, таким образом, $V_{20,w}$ на $V_{20,p}$, т.е. приводя значение s к условиям некоего гипотетического растворителя при 20°C, имеющего плотность и вязкость воды, но не меняющего V молекулы или частицы. Этим, в частности, могут объясняться расхождения в значениях приведенных коэффициентов седиментации $s_{20,w}$ того или иного вещества. — Прим. ред.

Хотя в большей части уравнений, выведенных в этой главе, коэффициенты седиментации и диффузии считались постоянными, в действительности же, в реальных условиях, их величина зависит от концентрации. Поэтому нередко (а зачастую это и необходимо) измеряют s и D как функции концентрации, а затем экстраполируют к бесконечному разбавлению, получая s^0 и D^0 ; далее проводят коррекцию этих величин с тем, чтобы получить значения, ожидаемые при 20°C в чистой воде при бесконечном разбавлении: $s_{20,w}^0$ ¹⁾ и $D_{20,w}^0$.

В табл. 11.1 приведены некоторые определенные опытным путем типичные значения $s_{20,w}$. Что можно сделать с этими величинами, зависит от ответа на вопрос: что еще известно о данной системе? Если известна молекулярная масса, то, определив $s_{20,w}$, мы найдем коэффициент трения f , который можно сравнить с $f_{\min}$, т.е. с коэффициентом, который имела бы сферическая частица той же массы при отсутствии гидратации. Можно проанализировать далее отношение $f/f_{\min}$ с тем, чтобы наложить ограничения на форму и степень гидратации частицы в точности так, как это было описано ранее для коэффициентов диффузии. В табл. 11.1 сравниваются коэффициенты трения, определенные с помощью диффузии и с помощью седиментации. В большинстве случаев эти величины довольно хорошо согласуются. Если же известны и $s_{20,w}$ и $D_{20,w}$, то молекулярную массу можно вычислить по формуле (11.33). Тогда, пользуясь любым из двух уравнений (11.32), получают коэффициент трения. Но, поскольку при седиментации и диффузии одинаково учитывается комбинированная зависимость от конформации и гидратации, знание обоих коэффициентов не проясняет вопроса о том, какая часть избыточного трения (сверх $f_{\min}$) происходит за счет гидратации. В табл. 11.2 сопоставляются молекулярные массы, при определении которых пользовались уравнением Сведберга, с величинами, полученными

Таблица 11.1

РЕЗУЛЬТАТЫ СЕДИМЕНТАЦИОННЫХ ИЗМЕРЕНИЙ¹⁾

Препарат	Молекулярная масса	$s_{20,w}$, S	$\bar{V}_2$, см ³ /г	$f/f_{\min}$, седиментация	$f/f_{\min}$, диффузия
Рибонуклеаза А (бычья)	12 400	1,85	0,728	1,29	1,14
Лизоцим (цыпленка)	14 100	1,91	0,688	1,22	1,32
Сывороточный альбумин (бычий)	66 500	4,31	0,734	1,33	1,31
Гемоглобин	68 000	4,31	0,749	1,28	1,14
Тропомозин	93 000	2,6	0,71	2,65	3,22
Фибриноген (человека)	330 000	7,6	0,706	2,34	2,35
Миозин (стержнообразная молекула)	570 000	6,43	0,728	3,63	3,05
Вирус кустистой карликово- сти томата	10 700 000	132	0,74	1,27	1,27
Вирус табачной мозаики	40 000 000	192	0,73	2,65	2,19

¹⁾ Данные взяты из нескольких источников, в том числе из работ Kuntz, Kauzmann, 1974; Tanford, 1961; Van Holde, 1971.

¹⁾ Величину $s_{20,w}^0$ часто называют константой седиментации, чтобы отличить ее от всевозможных коэффициентов седиментации. — Прим. ред.

Таблица 11.2

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАССЫ, ОПРЕДЕЛЕННЫЕ С ПОМОЩЬЮ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ

Препарат	Химическая структура	Седиментация и диффузия	Метод Арчибальда	Равновесное центрифугирование	Метод Шераги — Манделькерна	Другие методы
Сахароза	342,3	—	—	341,5	—	—
Рафиноза	504,5	—	495	—	—	—
Рибонуклеаза А (бычья)	13 683	12 400	13 750	13 700	15 200	—
Лизоцим (цыпленка)	14 211	14 100	—	14 500	12 400	14 100 ¹⁾
Сывороточный альбумин (бычий)	66 296	66 000	70 000	68 000	59 000	70 000 ²⁾

1) Рассеяние рентгеновских лучей под малыми углами.

2) Метод светорассеяния.

другими методами. Величины, полученные различными методами, в общем согласуются между собой. Они не обязательно должны в точности совпадать по ряду причин, хотя бы потому, например, что разные методы по-разному оценивают вклад противоионов в измеряемую массу.

Уравнением (11.33) нельзя пользоваться так часто, как хотелось бы, поскольку диффузионные измерения представляют определенные трудности. Как мы покажем, возможна комбинация седиментационных данных с результатами других гидродинамических измерений. Нередко бывает так, что коэффициент седиментации представляет собой единственную доступную информацию о гидродинамике частицы с неизвестной молекулярной массой, поскольку по сравнению с другими методами седиментационные опыты либо могут быть выполнены быстрее, либо требуют меньшего количества материала. Когда применяют чувствительный метод фотоэлектрического сканирования, для определения $s_{20,w}$ бывает достаточно менее 0,1 мг белка; в случае нуклеиновой кислоты это количество уменьшается еще на порядок. Измерения занимают не более нескольких часов, за это время граница успевает сместиться на расстояние порядка сантиметра; такое расстояние можно измерить очень точно.

Коэффициент $s_{20,w}$ получить нетрудно, но сама по себе эта величина не дает возможности определить форму или молекулярную массу, если не принять некоторых допущений относительно той или другой. Если макромолекула имеет вид сферы, то, подставляя выражения (10.68) и (10.69) в уравнение (11.28) (в этом случае фактор формы Перрена $F = 1$), получим

$$s = (M^{2/3}/N_0^{2/3})(1 - \bar{V}_2\rho)\{6\pi\eta[(3/4\pi)(\bar{V}_2 + \delta_1\bar{V}_1)]^{1/3}\}^{-1} \quad (11.35)$$

Коэффициент седиментации сферических молекул с близкими значениями степени гидратации и парциального удельного объема прямо пропорционален $M^{2/3}$. Это весьма полезный вывод. Если, к примеру, мы изучаем различные ассоциированные формы белковых субъединиц, то нетрудно установить при помощи седиментационных измерений, как соотносятся их молекулярные массы, при условии, что среди этих форм нет ни одной, слишком отличной от сферы. Уравнение (11.35) широко используют для оценки молекулярных масс при некоторых предположительных значениях степени гидратации. В боль-

шинстве случаев эти оценки весьма полезны, но в каждом отдельном случае исследователю не мешает известная доля здорового скептицизма.

ЧТО МОЖНО УЗНАТЬ О ФОРМЕ И КОНФОРМАЦИИ ПО ДАННЫМ СЕДИМЕНТАЦИОННЫХ ИЗМЕРЕНИЙ

Выводы теории, предсказывающие зависимость гидродинамического поведения частиц от их формы, можно проверить, взяв гомологический ряд молекул, идентичных во всех отношениях, за исключением длины. Удобной системой, использованной для этой цели Харрисоном и Клугом (Harrison, Klug, 1966), является вирус стеблевой пятнистости табака (ВСП). Инфекционный вирион представляет собой цилиндр диаметром 250 Å и длиной от 1850 до 1970 Å. Однако инфекционными свойствами обладают и более короткие частицы — их можно выделить и исследовать.

При рассмотрении гомологического ряда удобно представить коэффициент трения в виде $f = 6\pi\eta(3V_3/4\pi)^{1/3}F$, где V_3 — объем эквивалентной гидратированной сферы, а F — фактор формы. Фактический объем цилиндрического стержня равен $\pi r^2 l$, где l — длина, а r — радиус. Подставляя эти выражения вместо f и V_3 , мы можем переписать уравнение (11.28) в следующем виде:

$$M/l = \{[6\pi\eta N_0(3r^2/4)^{1/3}]/(1 - \bar{V}_2\rho)\} (sF/l^{2/3}) \quad (11.36)$$

Молекулярная масса на единицу длины (M/l) — величина постоянная для ряда гомологических стержней. Первый множитель в правой части уравнения также не меняется. Таким образом, теория предсказывает, что отношение $sF/l^{2/3}$ должно быть постоянной величиной. На рис. 11.10, А показан результат экспериментальной проверки этого вывода. Предсказание выполняется довольно точно, если использовать полученные Перреном значения F для вытянутых эллипсоидов вращения с отношениями осей $l/2r$.

Еще лучшее соответствие экспериментальным данным можно получить, если промоделировать стержни несколько более реалистически. Объем вытянутого эллипсоида вращения равен $4\pi ab^2/3$, где a — большая полуось, а b — малая полуось. Объем цилиндра равен $\pi r^2 l$. Мы должны приравнять оба объема друг к другу, чтобы при любой заданной весовой концентрации число частиц в растворе осталось прежним:

$$\pi r^2 l = 4\pi ab^2/3 \quad (11.37)$$

Теперь положим, что эллипсоид имеет ту же длину, что и стержень: $l = 2a$. Тогда уравнение (11.37) можно представить в такой форме:

$$l/a = 2 = 4b^2/3r^2 = (1/3)(b^2/r^2)(l^2/a^2) \quad (11.38)$$

Из уравнения, составленного из второго и четвертого выражений, после преобразований получаем

$$a/b = 1/6^{1/2}r = (2/3)^{1/2}(l/d) \quad (11.39)$$

где $d = 2r$ — диаметр стержня. Таким образом, отношение осей у эллипсоида получается несколько меньше, чем у стержня. В этом случае соответствие уравнения (11.36) экспериментальным данным почти идеальное (рис. 11.10, Б).

Точность седиментационных измерений позволяет проводить с их помощью довольно тонкие опыты по распознаванию структурных отличий. Измерение коэффициента седиментации гемоглобина дает величину $\sim 4,45$ S. Индивидуальный коэффициент седиментации каждой из четырех его субъединиц (две α и две β) равен примерно $1,77 \pm 0,055$ S. С помощью теории Кирквуда — Райзмана (разд. 10.2) можно оценить коэффициент седиментации тетрамера, зная свойства мономера. Если у тетрамера (t) и мономера (m) одно и то

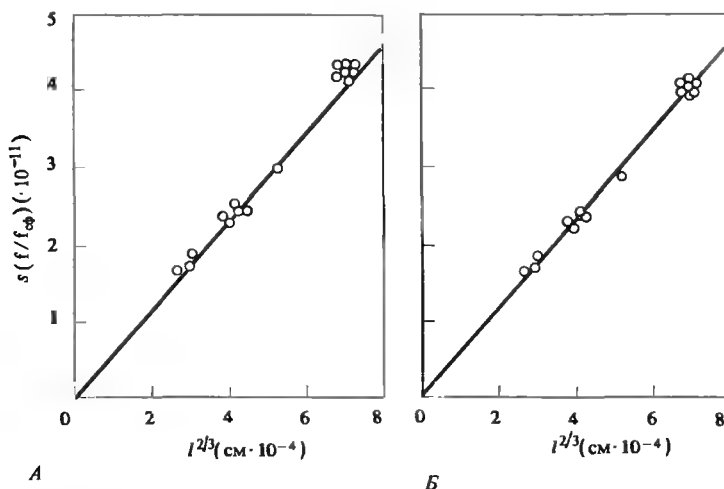


РИС. 11.10. Зависимость коэффициента седиментации частиц вируса стеблевой пятнистости табака (ВСП) от длины. Длину вируса (l) определяли с помощью электронного микроскопа и полученные размеры использовали при расчете f/f_{cf} для случая вытянутых эллипсоидов вращения. На приведенных здесь графиках показана фактическая зависимость определенной опытным путем длины в степени $2/3$ от произведения экспериментального значения s на расчетную величину f/f_{cf} . А. Отношение осей для эллипсоида вычисляли как l/d , где d — диаметр стержня. Б. Отношение вычисляли как $\sqrt{2}l/d$. [Harrison, Klug, Virology, 30, 738 (1966).]

же значение $\bar{V}_2$, то можно записать согласно уравнению (11.28):

$$s_t/s_m = (M_t/M_m)/(f_t/f_m) = 4f_m/f_t \quad (11.40)$$

где f_m/f_t можно рассчитать по уравнению (10.34); при расчете должна учитываться конкретная геометрическая модель тетрамера. Взяв экспериментальное значение коэффициента седиментации мономера и используя значения f/f_m , приведенные на рис. 10.12, мы можем предсказать, что $s = 3,91 \pm 0,11 S$ для линейного тетрамера, $s = 4,18 \pm 0,12 S$ для плоского «квадратного» тетрамера и $s = 4,43 \pm 0,13 S$ для тетраэдрического тетрамера. Точность данных, как можно видеть, достаточна для того, чтобы позволить нам сделать правильный вывод о том, что гемоглобин имеет тетраэдрическое расположение субъединиц. На рис. 11.11 представлены результаты применения теории Кирквуда — Райзмана в более сложном случае.

В тех случаях, когда седиментацию применяют для регистрации конформационных изменений, возникает потребность проводить как можно более точные измерения различий в седиментации двух образцов одного и того же вещества, находящегося в слегка различных условиях. Эффективным методом, разработанным для этой цели, является разностная седиментация¹⁾. Ячейка при этом содержит две одинаковые расположенные рядом полости секториальной формы для центрифугируемого раствора (двухсекторный вкладыш на рис. 11.3, Б). Каждый из сравниваемых образцов помещают в отдельный сектор и центрифугируют их вместе. Оптические системы устроены так, чтобы улавливать только различия между этими двумя секторами, почти так же, как это делается при разностной спектроскопии. Особенно удобно оказалось использовать для этой цели опти-

¹⁾ Не путайте с дифференциальным центрифугированием — препаративным методом разделения тяжелых и легких фракций. — Прим. ред.

Модель					
Число единиц	1	5	10	15	20
s (теоретическая)	20 S	59 S	100 S	131 S	156 S
s (экспериментальная) (<i>Loligo</i>)	19 S	59 S	97 S	—	—
s (экспериментальная) (<i>Busucon</i>)	—	60 S	100 S	130 S	155 S

РИС. 11.11. Найденные опытным путем и расчетные значения коэффициентов седиментации для двух видов гемоцианинов моллюсков (*Loligo* и *Busucon*). При расчете теоретических величин для олигомерных моделей, показанных на рисунке, пользовались теорией Кирквуда — Райзмана. [Bloomfield et al., Biopolymers, 5, 135 (1967).]

ческую систему Рэлея, которая регистрирует разность концентраций растворенного вещества в этих двух секторах как функцию радиального расстояния. Этот метод позволяет измерять такие малые различия в значениях коэффициентов седиментации, как 0,01 S, с точностью, превышающей 1%. Однако в данном случае к оптической системе предъявляются очень жесткие требования, что не позволяет использовать метод для рутинных измерений.

ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ СЕДИМЕНТАЦИИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ

Все, что мы говорили до сих пор, относится к двухкомпонентной системе (вода плюс макромолекулы) в предельном случае сильного разбавления. Если эти условия не выполняются, могут возникнуть значительные трудности. Здесь мы кратко рассмотрим некоторые наиболее часто встречающиеся эффекты.

Даже в двухкомпонентной системе скорость седиментации зависит от концентрации растворенного вещества. Зависимость коэффициента седиментации от концентрации в случае, когда в системе присутствует один молекулярный компонент, можно описать формулами вида

$$s = s^0(1 + k'c)^{-1} \quad (11.41)$$

или

$$s = s^0(1 - k''c) \quad (11.42)$$

где s^0 — величина, соответствующая бесконечному разбавлению, а k' и k'' — эмпирически подбираемые константы. Оба уравнения объясняют уменьшение наблюдаемой скорости седиментации с увеличением концентрации (рис. 11.12). При малых значениях c оба уравнения эквивалентны, так как $(1 + kc)^{-1} = 1 - kc +$ (члены высших порядков по c). Однако эти выражения предсказывают весьма различное поведение при высоких концентрациях.

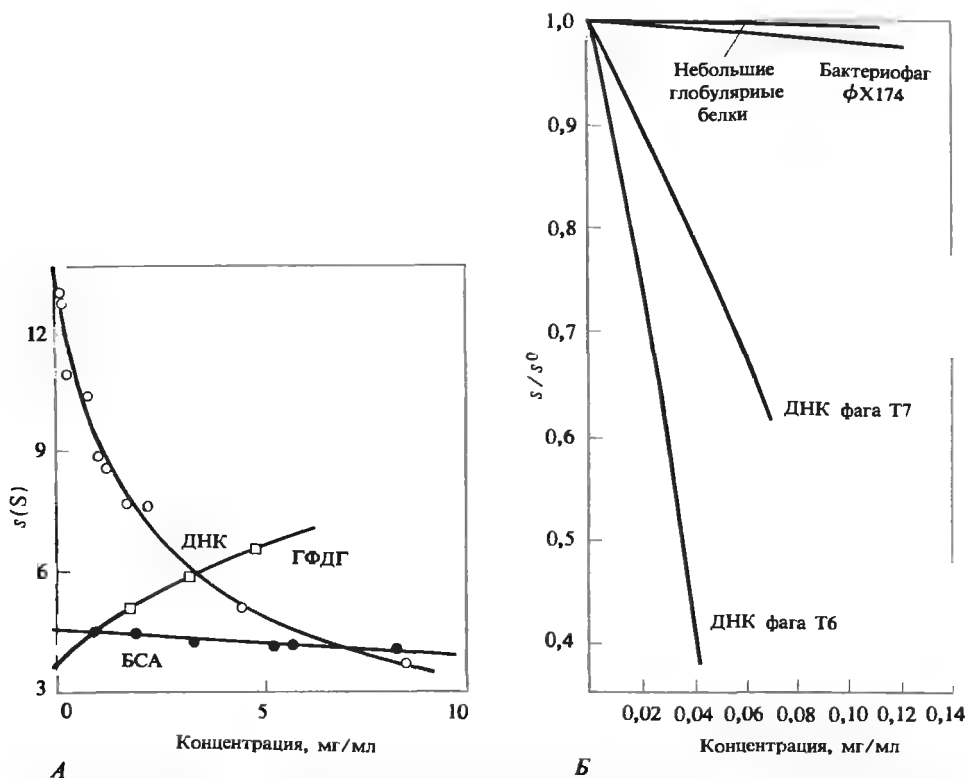


РИС. 11.12. Зависимость коэффициента седиментации от концентрации. А. Результаты седиментационных измерений для трех видов макромолекул: ДНК с мол. массой $\sim 3 \cdot 10^6$, бычьего сывороточного альбумина (БСА) и глицерофосфатдегидрогеназы (ГФДГ) (Tanford, 1961; Van Holde, 1971). Б. Данные по седиментации в относительных единицах для некоторых других молекул. Обратите внимание на то, что зависимость от концентрации усиливается по мере увеличения молекулярной массы, которая у ДНК бактериофага T7, например, равна $2,5 \cdot 10^7$. (Freifelder, D., 1976. *Physical Biochemistry*, p. 285. San Francisco, W.H. Freeman and Company.)

Физическое обоснование этих двух равенств также весьма неодинаково. Такой вид зависимости, как в уравнении (11.41), следует ожидать в том случае, когда основным следствием изменения концентрации растворенного вещества является изменение фрикционных свойств раствора. Коэффициент седиментации прямо пропорционален f^{-1} , а f прямо пропорционален вязкости раствора. Как показано в гл. 12, η всегда можно представить в виде степенного ряда по концентрации растворенного вещества. Первые два члена разложения дают $\eta = \eta_0(1 + [\eta]c)$, где η_0 — вязкость чистого растворителя, а $[\eta]$ — коэффициент, называемый характеристической вязкостью. Скомбинировав это выражение с уравнением (10.68), введя затем полученный результат в уравнение (11.28) и пренебрегая влиянием концентрации на плотность, получим уравнение (11.41), в котором $k' = [\eta]$. В действительности, однако, это уравнение обычно не слишком хорошо соответствует экспериментальным данным. Найденные опытным путем значения k' зачастую оказываются больше аналогичных значений $[\eta]$; исключение составляет ДНК.

Уравнение (11.42) соответствует случаю, когда главной причиной уменьшения скорости седиментации при увеличении концентрации растворенного вещества является противо-

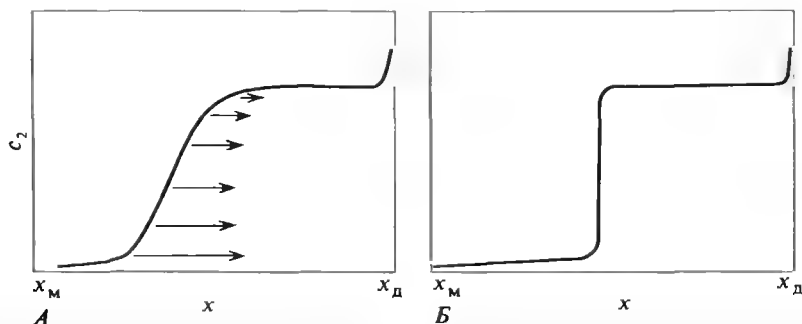


РИС. 11.13. Сужение границы. А. Допустим, что в концентрированном растворе ДНК образуется широкая граница. Тогда приведенная на рис. 11.12 зависимость s от концентрации означает, что различные точки этой границы движутся с весьма неодинаковыми скоростями. Б. В концентрированном растворе ДНК широкая граница никогда в действительности не наблюдается. Здесь формируется сверхрезкая граница, стабилизированная эффектами, показанными на рис. А.

ток растворителя. Например, сферическая частица увлекает за собой приблизительно в четыре раза больший, чем занимает она сама, объем растворителя. Поэтому при седиментации макромолекул значительно больший по объему поток растворителя протекает в ячейке в направлении, обратном направлению седиментации. Этот поток прямо пропорционален объему седиментирующих макромолекул, умноженному на их скорость. С точки зрения наблюдателя, находящегося вне ячейки, движение макромолекул замедляется, на самом деле они «плывут» против течения. В гл. 12 мы покажем, что коэффициент $[\eta]$ в разложении вязкости в степенной ряд прямо пропорционален объемной доле, занимаемой растворенным веществом. Таким образом, k' и k'' связаны между собой и в предельном случае низких концентраций совпадают. При высоких концентрациях ни уравнение (11.41), ни уравнение (11.42) не в состоянии достаточно хорошо объяснить экспериментальные данные, и в этом случае требуются более сложные выражения.

Форма наблюдаемой в седиментационном опыте границы может очень сильно зависеть от концентрации растворенного вещества. При центрифугировании концентрированного раствора ДНК молекулы в области плато седиментируют медленно (как показано на рис. 11.12), поскольку на них в полной мере сказывается влияние высокой концентрации. Допустим, что граница широкая (рис. 11.13, А). Концентрация тех молекул ДНК, которые находятся в хвостовой части границы, очень мала, и поэтому они должны седиментировать очень быстро. Но тогда они догонят те молекулы, которые находятся в головной части границы, т.е. широкая граница не может образоваться, даже если диффузия значительна. Граница сжимается и при дальнейшей седиментации остается резкой (рис. 11.13, Б) независимо от степени гетерогенности препарата по молекулярным массам.

ВЛИЯНИЕ САМОАССОЦИИАЦИИ НА СКОРОСТЬ СЕДИМЕНТАЦИИ

Как показывает одна из экспериментальных кривых, изображенных на рис. 11.12, с увеличением концентрации коэффициент седиментации может и возрастать. Пользуясь аргументацией, в точности противоположной той, которая употреблялась для объяснения сжатия границы, можно предсказать, что в этом случае должно происходить уширение границы. Действительно, так оно и есть, но чем это вызвано? Допустим, что белковый мономер P способен к самоассоциации с образованием олигомеров вида $2P \rightleftharpoons P_2$ или еще больших агрегатов по формуле $nP \rightleftharpoons P_n$. Если скорости взаимных превращений пре-

небрежимо малы (по шкале времени седиментационного опыта), то мы должны наблюдать две границы, одна из которых соответствует P , а другая — P_2 (или P_n).

Если скорости взаимных превращений достаточно велики для того, чтобы успевало установиться равновесие мономер—димер, то обе границы сливаются в одну асимметричную границу. Даже если пренебречь влиянием концентрации на характеристические скорости седиментации, такая граница имеет сложную форму, которую можно проанализировать с помощью теории, разработанной Гилбертом (см. Cann, 1970; Van Holde, 1975). Общая концентрация растворенного вещества близка к нулю в хвостовой части границы, и равновесие сдвинуто в сторону образования мономера. В головной части границы, если концентрация там достаточно велика, происходит преимущественное образование димера. В результате образуется асимметричная граница, а положение в ячейке максимального значения ds/dx зависит от того, насколько равновесие сдвинуто в сторону образования мономера или димера.

В случае быстрого установления равновесия в системе мономер — n -мер ($n > 2$) наблюдаются две границы в некотором диапазоне концентраций, причем с увеличением концентрации относительная высота более быстрой границы будет расти. В пределе, при низкой или высокой концентрациях, образуется единственная асимметричная граница. Если вещество может находиться только в двух формах, то иногда можно определить молекулярную массу агрегата (и даже получить информацию о константе связывания), анализируя относительное расположение и высоты границ. В общем виде, однако, точный анализ формы границы в системах с реагирующими компонентами является чрезвычайно трудной задачей, которая все еще находится в стадии разработки.

Независимо от того, что происходит в районе границы, некоторую информацию можно получить при измерениях в области плато. Является ли система смесью реагирующих или не реагирующих компонентов — согласно уравнению (11.4), поток в области плато (или в области самого последнего плато, минуя все наблюдаемые границы) можно описать выражением вида

$$J_n = \omega^2 x \sum_i c_i s_i \quad (11.43)$$

где c_i — весовая концентрация материала с коэффициентом седиментации s_i , а диффузионный член отсутствует, поскольку $\sum_i (\partial s_i / \partial x_i) = 0$. По аналогии с уравнением (11.16) скорость изменения полной концентрации в области плато можно записать в виде

$$dc_n/dt = d\left(\sum_i c_i\right)/dt = -2\omega^2 \sum_i c_i s_i \quad (11.44)$$

Величину dc_n/dt можно определить экспериментально. Если бы мы не знали заранее о существовании смеси, мы связали бы эту величину с кажущимся коэффициентом седиментации $\bar{s}$:

$$dc_n/dt = -2\omega^2 \bar{s} c_n = -2\omega^2 \bar{s} \sum_i c_i \quad (11.45)$$

Приравняв друг другу правые части равенств (11.44) и (11.45), мы увидим, что кажущийся коэффициент седиментации, который находят из опыта, $\bar{s} = \sum_i s_i c_i / \sum_i c_i$. Так как c_i из-

меряется в весовых единицах, $\bar{s}$ представляет собой средневесовое значение коэффициента седиментации. Для некоторых целей $\bar{s}$ может быть полезен; ясно, однако, что при усреднении значительная часть информации о системе утрачивается.

КАК ВЛИЯЕТ НА СКОРОСТЬ СЕДИМЕНТАЦИИ ПРИСУТСТВИЕ В СИСТЕМЕ НЕСКОЛЬКИХ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПОНЕНТОВ

Если подвергнуть седиментации смесь, состоящую из макромолекул более чем одного сорта, то, как правило, наблюдается не одна граница, причем анализ границ в многокомпонентной системе — задача довольно сложная. Седиментация в смеси, состоящей из двух или более компонентов, зависит от концентрации всех компонентов в данном месте. К тому же противоток, создаваемый быстрым компонентом, сказывается на движении медленного компонента, а в некоторых случаях он может даже преобладать над седиментацией медленного компонента.

Чтобы проиллюстрировать этот эффект, мы рассмотрим несколько необычный опыт, в котором граница быстрого компонента оказывается ближе к оси вращения, чем граница медленного компонента. Такого рода ситуацию можно на короткое время создать при центрифугировании в ячейке, предназначенной для формирования искусственной границы (рис. 11.14, А). С этой целью используют двухсекторную ячейку, в которой два сектора соединены капиллярными каналами. При обычной силе тяжести гидростатического давления недостаточно, чтобы преодолеть сопротивление каналов течению. Но при центрифугировании гидростатические силы становятся чрезвычайно большими, и перепад между уровнями жидкости в секторах уничтожается перетеканием жидкости через эти каналы.

Для того чтобы создать искусственную границу медленно седиментирующей ДНК на фоне однородного раствора вируса карликовой кустистости томата (ВКК), поместим в один сектор небольшое количество раствора ВКК, а в другой сектор — большее количество раствора ВКК при той же концентрации и ДНК. На рис. 11.14 показано, как спустя весьма непродолжительный период времени перетекание жидкости приводит к появлению в одном из секторов границы ДНК на фоне равномерной концентрации ВКК. Этот сектор мы и будем в дальнейшем рассматривать. Близ мениска быстро формируется граница ВКК, которая перемещается ко дну ячейки с коэффициентом седиментации $\sim 120S$. В параллельном опыте, где ДНК седиментирует в чистом растворителе, она двигалась бы в том же направлении с коэффициентом седиментации $\sim 10S$. Однако в данном опыте ДНК движется в обратном направлении с коэффициентом седиментации $\sim -10S$ в окружении седиментирующих частиц ВКК. Таким образом, противоток увлекает ДНК со скоростью $\sim 20S$. Схематическая иллюстрация на рис. 11.14, Б слишком упрощенно представляет то, что происходит в действительности, поскольку не учитывает еще один эффект.

Высота границы равна $[(\partial c / \partial x) dx]$; в системе с одним компонентом это просто c_{Π} , т.е. эта высота является мерой концентрации в области плато. Давно известно, однако, что при седиментации смеси, состоящей из двух компонентов, высоты границ не соответствуют истинным парциальным концентрациям. Этот феномен называется эффектом Джонстона—Огстона. Чтобы упростить объяснение этого эффекта, в последующих рассуждениях временно не будем учитывать радиальное разбавление. Быстрый компонент всюду седиментирует в окружении медленного с коэффициентом s_B (рис. 11.15, А). Медленный же компонент должен иметь два разных коэффициента седиментации: s_M — в области, расположенной выше границы быстрого компонента, где на него влияет лишь его собственная концентрация, и $s_{M,B}$ — ниже этой границы, где присутствуют оба компонента. Согласно равенству (11.41) или (11.42), $s_{M,B} < s_M$, что приводит к нетривиальным следствиям. Представьте себе, что вы *движетесь вместе* с быстрой границей и следите за движением медленного компонента. Взглянув в направлении мениска, вы увидели бы, что медленный компонент отдаляется от вас, причем величина потока $J = \omega^2 x (s_B - s_M) c_M$. Посмотрев в противоположную сторону, вы увидели бы, что медленный компонент приближается к вам, и в этом случае величина потока равна $J' = \omega^2 x (s_B - s_{M,B}) c_{M,B}$. Поскольку J' больше, чем J , из приведенных выше равенств следует, что медленно седимен-

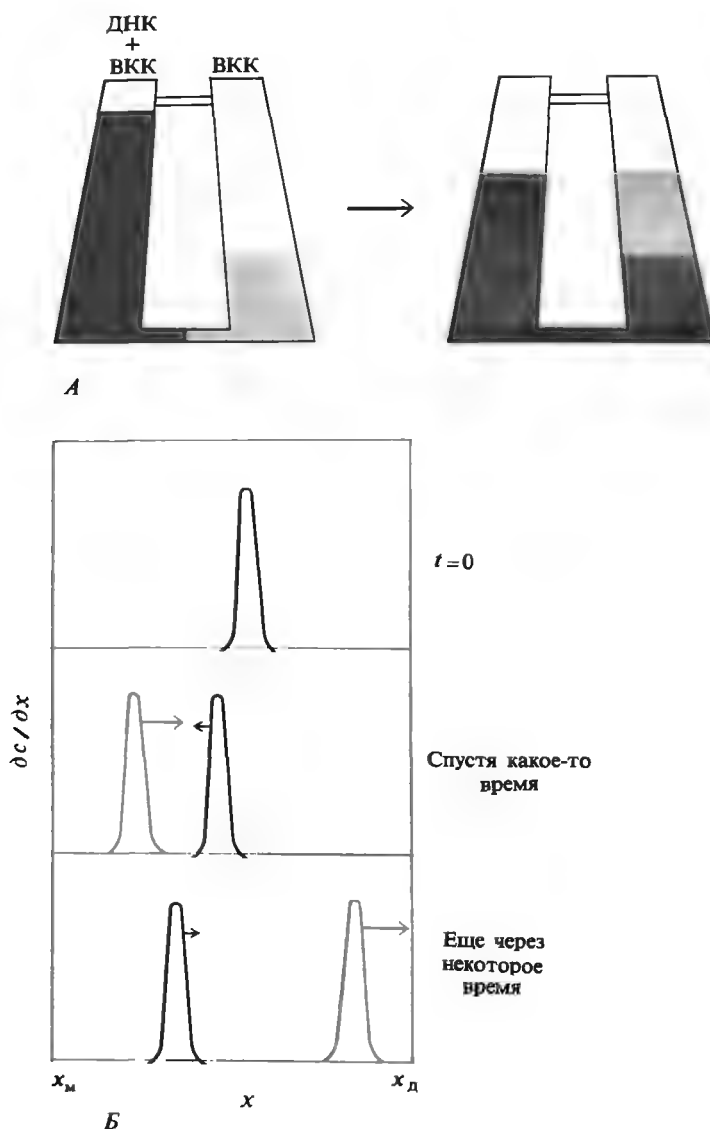


РИС. 11.14. Демонстрационный опыт, доказывающий существование противотока растворителя. А. В ячейке, предназначенной для создания искусственной границы, в один сектор загружают раствор вируса карликовой кустистости томата (ВКК), а в другой — смесь вируса с ДНК. При центрифугировании под действием гидростатических сил в обоих секторах устанавливается одинаковый уровень жидкости, что приводит к появлению границы ДНК в средней части правого сектора. Б. Седиментационные профили, наблюдаемые в правом секторе в разные моменты времени после того, как закончилось перетекание жидкости из одного сектора в другой. Исходная граница ДНК движется к мениску до тех пор, пока не встретится с границей ВКК. Тогда направление ее движения меняется на обратное, и она движется ко дну ячейки.

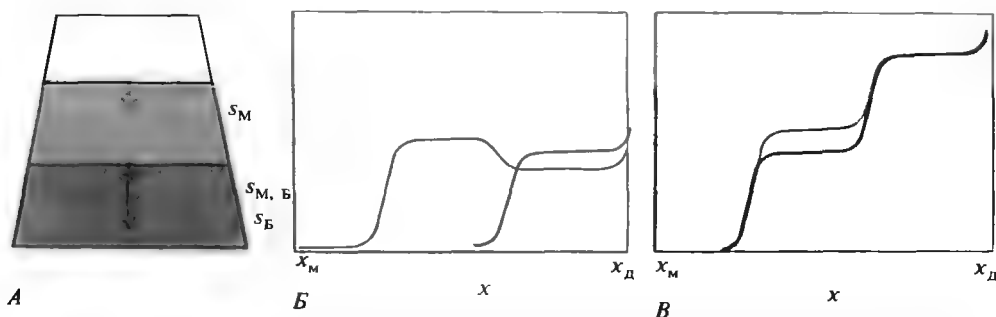


РИС. 11.15. Эффект Джонсона—Огстона в двухкомпонентной системе. *А*. Скорость седиментации медленного компонента падает при переходе через границу быстрого компонента из-за увеличения суммарной концентрации ниже этой границы. *Б*. Распределения концентраций быстрого и медленно-го компонентов в ячейке в процессе седиментации, которые следовало бы ожидать, если бы мы могли отдельно измерить ту и другую концентрацию. *В*. Распределение суммарной концентрации обоих компонентов в ячейке в процессе седиментации. Коричневой линией обозначено наблюдаемое в опыте распределение, черной линией — распределение, которое следовало бы ожидать, если бы эффект Джонсона—Огстона отсутствовал.

тирующее вещество должно непрерывно накапливаться в области быстрой границы. Однако такое накопление невозможно, так как оно привело бы к созданию большой локальной плотности. Быстрый компонент замедлил бы свое движение благодаря коэффициенту $1 - \bar{V}_2\rho$ в уравнении (11.28), и, кроме того, возник бы эффект гравитационной неустойчивости. Граница имела бы плотность большую, чем нижерасположенные слои, и была бы увлечена на дно конвекционными токами.

Если задача решена правильно, то мы увидим, что вместо этого перераспределяется концентрация медленного компонента, и подобной катастрофы не происходит. При этом соблюдается условие сохранения величины потока медленного компонента в области быстрой границы, $J = J'$, откуда следует, что

$$c_{M,B}(s_B - s_{M,B}) = c_M(s_B - s_M) \quad (11.46)$$

Поскольку $s_{M,B} < s_M$, концентрация c_M медленного компонента в области, расположенной выше быстрой границы, будет больше, чем концентрация $c_{M,B}$ по другую сторону границы (рис. 11.15, *Б*). Поэтому высота медленной границы будет больше, чем мы наивно полагали, а высота быстрой границы будет меньше ожидаемого значения, так как с помощью большинства оптических методов регистрируется сумма концентраций обоих компонентов.

ЗОНАЛЬНОЕ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ СИСТЕМ

Эффект Джонсона—Огстона и другие эффекты, связанные с многокомпонентностью системы, особенно сильно проявляются при скоростной седиментации, потому что все компоненты, за исключением самого медленного, всегда присутствуют совместно с другими. Это также означает, что седиментация в том виде, в каком она описана до сих пор, недостаточно эффективна как метод разделения или очистки компонентов, кроме тех случаев, когда их скорости седиментации сильно различаются.

Метод зонального центрифугирования свободен от обоих указанных недостатков. Раствор макромолекул наносят тонким слоем на поверхность растворителя, занимающего

гораздо больший объем. При аналитическом ультрацентрифугировании это можно сделать с помощью вкладыша для наслоения (рис. 11.16, А), который принципиально не отличается от вкладыша в упоминавшейся ранее ячейке для создания искусственной границы. Смесь, состоящая из нескольких компонентов с различными коэффициентами седиментации, быстро разделяется на отдельные зоны, которые перемещаются каждая со своей скоростью седиментации. Из-за диффузии каждая зона несколько расплывается и теоретически должна иметь гауссову форму (уравнение Б из Дополнения 10.3). В действительности концентрация в зоне распределяется более сложным образом. Поскольку ускоряющая сила возрастает как $\omega^2 x$, передняя часть зоны движется быстрее, чем задняя. Кроме того, на форму распределения молекул внутри зоны влияет также зависимость скорости седиментации от концентрации. Тогда как в передней и задней частях зоны концентрация мала, и там молекулы движутся быстро, в середине зоны концентрация гораздо выше, и здесь их скорости меньше. В результате зона имеет широкий передний и узкий задний фронт (рис. 11.16, Б).

Отметим одно из главных достоинств метода зонального центрифугирования. Оно заключается в том, что весь исследуемый биологический материал сконцентрирован в не-

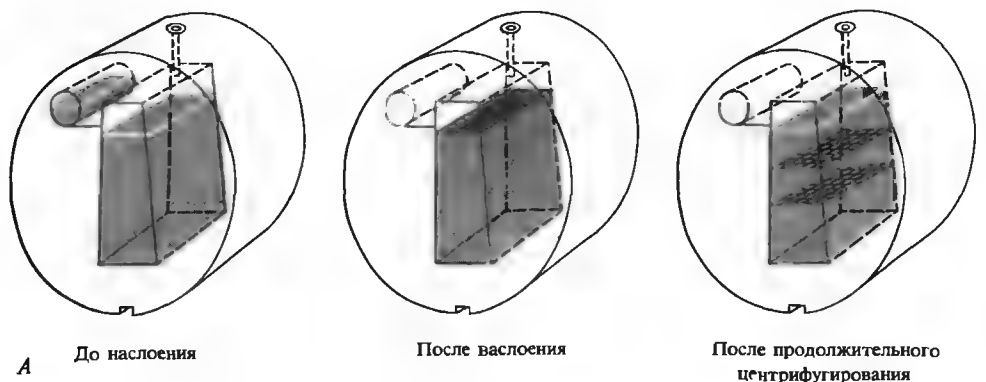
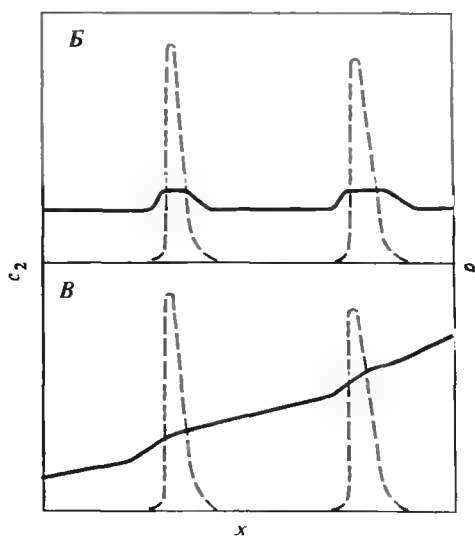


РИС. 11.16. Зональное центрифугирование. А. Вкладыш для наслоения. Схематически показано, как происходит наслоение и разделение. Вкладыш работает по тому же принципу, что и ячейка для создания искусственной границы, изображенная на рис. 11.14, А. (Vinograd, Bruner, Fractions, Beckman Instruments, Inc., no. 1, p. 2, 1966.) Б. Распределение в ячейке концентрации растворенного вещества (штриховая линия) и общей плотности раствора (сплошная линия) в отсутствие стабилизирующего градиента плотности. В. Те же распределения при наличии стабилизирующего градиента плотности.



большом объеме, и это значительно увеличивает чувствительность метода. Для зонального центрифугирования требуется гораздо меньше материала, чем для других методов; так, для получения обнаружимой зоны достаточно менее 1 мкг ДНК.

Зональная седиментация была бы невозможна в гомогенном растворе из-за эффектов гравитационной неустойчивости. В зоне с исследуемым материалом плотность была бы больше, чем в слоях раствора, расположенного ниже, и вся масса той части раствора, где находится зона, попросту соскользнула бы на дно. Например, плотность раствора ДНК с концентрацией 0,01 мг/мл была бы примерно на $2 \cdot 10^{-5}$ г/см³ больше плотности растворителя. Это различие в плотности, однако, усиливается в силовом поле в $4 \cdot 10^5 g$, типичном для ультрацентрифуги. Такая ситуация приблизительно эквивалентна попыткам заставить ртуть держаться на поверхности воды. Хорошо известно, чем закончатся эти попытки.

Чтобы преодолеть эту трудность, необходимо создать градиент плотности. Это можно осуществить и в умеренно разбавленных солевых растворах, применяемых в аналитическом ультрацентрифугировании, если исследуемый материал первоначально находится в более разбавленном растворе. Когда слой с исследуемым материалом нанесен на поверхность основного объема растворителя, из-за быстрой диффузии малых молекул образуется пологий градиент плотности (рис. 11.16, Б). Перепад плотности от мениска до дна ячейки может составлять всего 1%, так что это почти не влияет на скорости седиментации. При центрифугировании градиент остается стабильным (и даже увеличивается), поскольку молекулы соли имеют большую, чем у воды, плотность. Большие силы в ультрацентрифуге могут влиять даже на небольшие ионы. Однако градиенты в разбавленных солевых растворах недостаточно стабильны вне центрифуги. Если вы захотели бы извлечь очищенный материал соответствующей зоны, вам пришлось бы отсасывать его, пока ротор еще крутится. Это возможно, но в большинстве случаев существует более простое решение.

Препаративное зональное центрифугирование применяют в основном как метод очистки. При этом пользуются заранее сформированным градиентом концентрации относи-

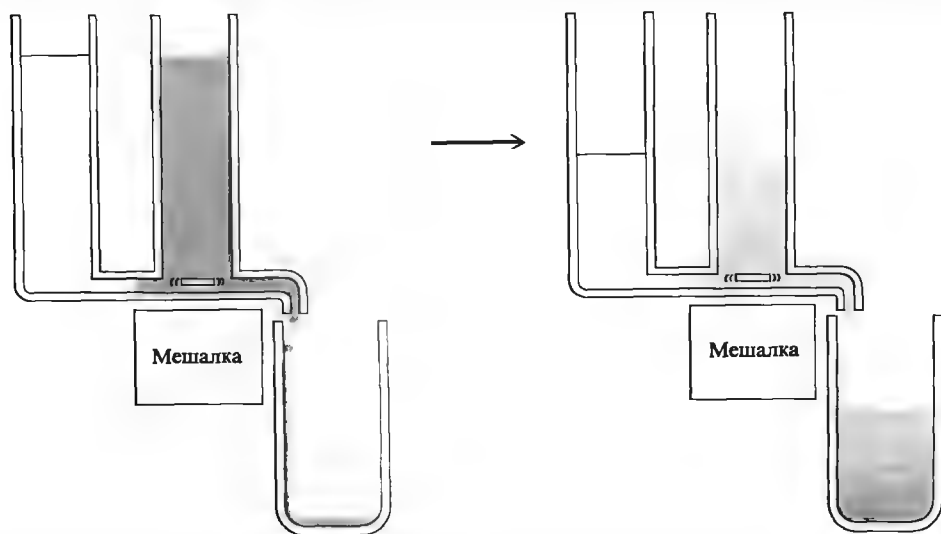


РИС. 11.17. Прибор для получения линейного градиента плотности. Предполагается, что все то время, пока прибор работает, в правом сосуде с помощью мешалки обеспечивается гомогенность раствора.

тельно вязкого вещества, взятого в качестве ингредиента раствора. Обычно применяют линейный градиент сахарозы с диапазоном изменения концентрации от 5 до 20%. Другой распространенный ингредиент — глицерин. Линейный градиент легко приготовить с помощью смесителя (рис. 11.17) (см. Дополнение 11.2). Такой градиент более стабилен вне центрифуги, чем градиент в слабоконцентрированных солях. Во время центрифугирования он также мало изменяется, поскольку вязкость концентрированной сахарозы затрудняет перераспределение вещества. Таким образом, исследуемый препарат можно наслаивать поверх заранее сформированного градиента в центрифужной пробирке, если только плотность препарата меньше плотности у мениска. Находившиеся в препарате молекулы растворенного вещества будут седиментировать вдоль градиента, поскольку коэффициент $(1 - \bar{V}_2\rho)$ всюду больше нуля. Через некоторое время, достаточное для того, чтобы молекулы растворенного вещества продвинулись на некоторое расстояние в направлении дна в центрифужной пробирке, центрифугу останавливают. Пробирку вынимают из ротора и содержимое осторожно извлекают из пробирки, либо проколоч дно и собирая его по каплям, либо вводя на дно пробирки более плотный раствор сахарозы и производя отбор сверху. Собранные фракции анализируют тем или иным способом.

Дополнение 11.2

ГРАДИЕНТ, ФОРМИРУЕМЫЙ В СМЕСИТЕЛЬНОЙ КАМЕРЕ

Прибор со смесительной камерой изображен на рис. 11.17. Мы хотим показать, что в пробирке создается линейный градиент. Так как уровни в двух сообщающихся сосудах смесителя должны быть одинаковыми, раствор в правом сосуде занимает объем $V_{\text{пр}} = V_0 - (1/2)V_{\text{к}}$, где V_0 — первоначальный объем, а $V_{\text{к}}$ — объем всех капель, попавших из смесителя в пробирку. Масса растворенного вещества в правом сосуде: $M_{\text{пр}} = c_{\text{пр}} V_{\text{пр}}$, где $c_{\text{пр}}$ — концентрация в том же сосуде. Скорость изменения массы с каждой упавшей каплей должна составлять $dM_{\text{пр}}/dV_{\text{к}} = -c_{\text{пр}} + (1/2)c_{\text{л}}$, поскольку правый сосуд теряет одну каплю своего содержимого при концентрации $c_{\text{пр}}$, но получает полкапли из левого сосуда при концентрации $c_{\text{л}}$. Однако можно также выразить эту производную по правилу дифференцирования сложной функции:

$$dM_{\text{пр}}/dV_{\text{к}} = V_{\text{пр}}(dc_{\text{пр}}/dV_{\text{к}}) + c_{\text{пр}}(dV_{\text{пр}}/dV_{\text{к}}) = (V_0 - \frac{1}{2}V_{\text{к}})(dc_{\text{пр}}/dV_{\text{к}}) - \frac{1}{2}c_{\text{пр}}$$

Приравняв друг другу оба выражения для $dM_{\text{пр}}/dV_{\text{к}}$, мы получим простое дифференциальное уравнение:

$$-2dc_{\text{пр}}/(c_{\text{пр}} - c_{\text{л}}) = dV_{\text{к}}/(V_0 - \frac{1}{2}V_{\text{к}})$$

Интегрируя от $c_{\text{пр}}(0)$ до $c_{\text{пр}}(V_{\text{к}})$ при изменении $V_{\text{к}}$ от 0 до $V_{\text{к}}$, получим:

$$[c_{\text{пр}}(V_{\text{к}}) - c_{\text{л}}]/[c_{\text{пр}}(0) - c_{\text{л}}] = 1 - V_{\text{к}}/2V_0$$

Концентрация убывает линейно в правом сосуде по мере того, как раствор попадает по каплям в пробирку, следовательно, концентрация в пробирке должна линейно убывать с высотой.

Посредством анализа в градиенте сахарозы очень трудно определить абсолютное значение коэффициента седиментации. Получаемая при этом информация относится только к одному моменту времени, и поэтому при интерпретации положения зоны в пробирке существует неопределенность, поскольку время разгона и время торможения ротора не всегда известны с достаточной точностью. Еще более серьезная проблема — прямое влия-

ние самой сахарозы. Плотность и вязкость раствора изменяются от точки к точке, а потому и s не является постоянной величиной, так что для вычисления s нельзя воспользоваться уравнением (11.18). На практике неизвестный препарат обычно центрифугируют вместе со стандартами. Удобными стандартами служат ферменты или меченные изотопами вещества, которые можно добавить в следовых количествах и легко обнаружить в материале фракций после завершения центрифугирования. Часто коэффициент седиментации неизвестного вещества определяют, заключая его между двумя стандартами с известными $s_{20,w}$ и принимая, что на участке между двумя стандартами s является линейной функцией расстояния в пробирке. Это допущение неверно для большинства градиентов, и такую процедуру следует применять только в тех случаях, когда стандарты почти совпадают с исследуемым веществом.

Если требуется получить точные значения коэффициентов седиментации при помощи препаративного центрифугирования в градиенте плотности, то наилучшим решением является создание изокINETического градиента. Последний формируется таким образом, чтобы за счет отношения $[1 - \bar{V}_2\rho(x)]/[\eta(x)]$ полностью скомпенсировать прирост ускоряющей силы с увеличением x . Аппроксимацией такого градиента может служить надлежащим образом подобранный экспоненциальный градиент какого-либо компонента раствора, при добавлении которого ρ и η раствора изменяются пропорционально его концентрации. Тогда коэффициент седиментации является линейной функцией пройденного расстояния. При этом не следует забывать, что величины $\bar{V}_2$ препаратов и стандартов должны совпадать. Надо также отдавать себе отчет в том, что в концентрированной сахарозе могут обнаружиться заметные термодинамические эффекты, связанные с трехкомпонентностью системы. При правильном подходе, однако, центрифугирование в градиенте сахарозы является чрезвычайно эффективным средством исследования.

11.3. Равновесное центрифугирование

Предположим, что раствор макромолекул центрифугируют при скоростях, которые недостаточно велики для того, чтобы макромолекулы попали на дно ячейки и образовали там плотный осадок. Процесс переноса не прекращается, но в конце концов устанавливается равновесие (рис. 11.18). С течением времени растворенное вещество уходит из ближней к мениску области, и наблюдается тенденция к его накоплению около дна ячейки. Диффузионные силы слишком велики и не дают образоваться границе, поэтому в конечном счете вдоль всей ячейки устанавливается плавный градиент концентрации. Можно показать, что время, которое понадобится для того, чтобы установился равновесный градиент, зависит от $(x_m - x_d)^2$. Для стандартных вкладышей с секториальной полостью, применяемых в скоростной седиментации, это время превышает практически возможности; однако время опыта достигает разумных пределов, если значительно уменьшить высоту столба жидкости.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ ПРИ ПОМОЩИ РАВНОВЕСНОГО ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ

После установления равновесия поток растворенного вещества J_2 всюду в ячейке должен быть равен нулю. Воспользовавшись либо уравнением (11.31) с поправкой на неидеальность раствора, либо уравнением (11.4) и соответствующими выражениями для s и D молекулы, мы можем написать

$$[c_2\omega^2 x M(1 - \bar{V}_2\rho)]/N_0 f = (kT/f)[1 + \partial(\ln \hat{\gamma}_2)/\partial(\ln c_2)](\partial c_2/\partial x) \quad (11.47)$$

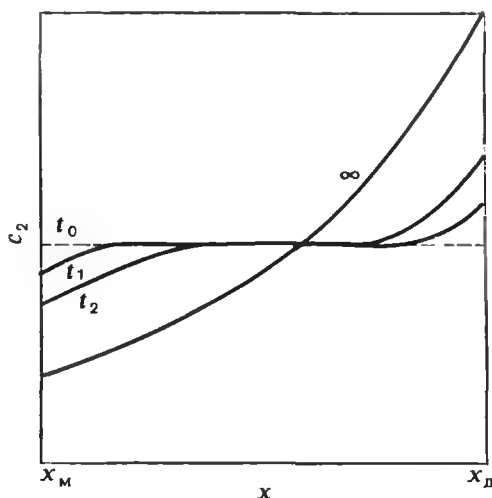


РИС. 11.18. Установление равновесного распределения концентраций растворенного вещества при центрифугировании. (Tanford, Physical Chemistry of Macromolecules, New York, Wiley, 1961.)

Произведя преобразования, так чтобы все величины, доступные измерению, оказались по одну сторону равенства, и сокращая f , получим

$$M[1 + \hat{c}(\ln \hat{c}_2) \hat{c}(\ln c_2)]^{-1} = [RT/(1 - \bar{V}_2\rho)\omega^2](1/c_2x)(\partial c_2/\partial x) = [2RT/(1 - \bar{V}_2\rho)\omega^2][\partial(\ln c_2)/\partial x^2] \quad (11.48)$$

Отметим, что остались одни лишь термодинамические величины, такие, как T и $\bar{V}_2$. Так и должно быть — коэффициент трения не играет никакой роли при равновесии. В идеальных растворах или при низких концентрациях растворенного вещества член, содержащий коэффициент активности, исчезает, и уравнение (11.48) можно проинтегрировать, приняв в качестве граничного условия значение концентрации c_2 в некоторой точке отсчета x_0 :

$$c_2(x) = c_2(x_0) \exp\{[M(1 - \bar{V}_2\rho)\omega^2/2RT](x^2 - x_0^2)\} \quad (11.49)$$

Из уравнений (11.48) и (11.49) следует, что для определения молекулярной массы достаточно знать наклон прямой на графике зависимости $\ln c_2$ от x^2 .

Для того чтобы оценить, какую скорость вращения ротора следует выбрать при равновесных измерениях, можно воспользоваться уравнением (11.49). Имея типовую оптическую систему, можно выполнить измерения с достаточной точностью, если концентрация растворенного вещества уменьшилась в два раза на протяжении 1 мм вдоль ячейки. С учетом этого условия для $M = 50\,000$, $x_0 = 6$ см и $\bar{V}_2 = 0,75$ см³/г из уравнения (11.49) получаем угловую скорость ω , равную 10 400 об/мин. Она в 5 раз меньше (а возникающие при этом силы в 25 раз меньше) тех значений, которые характерны для опытов по скоростной седиментации.

Чтобы получить несколько иную форму уравнения (11.49), которой удобно пользоваться при определении молекулярной массы, можно применить закон сохранения массы. Общее количество растворенного вещества после установления равновесия в ячейке должно оставаться тем же, что и в начале опыта. Исходная масса растворенного вещества составляет

$$\int_{x_M}^{x_D} \phi a c_0 x dx = \frac{1}{2} \phi a c_0 (x_D^2 - x_M^2) \quad (11.50)$$

где c_0 — равномерная начальная концентрация. Величину полной массы при равновесии получим, пользуясь первой и второй частями равенства (11.48), после преобразований и интегрирования. Для идеальных растворов

$$\phi a \int_{x_m}^{x_d} c_2(x) x dx = [RT/M(1 - \bar{V}_2 \rho) \omega^2] \phi a \int_{x_m}^{x_d} dc_2 = [RT/M(1 - \bar{V}_2 \rho) \omega^2] \phi a (c_d - c_m) \quad (11.51)$$

где c_d и c_m — концентрации растворенного вещества у дна и в области мениска соответственно. Из равенства выражений (11.50) и (11.51) следует формула для молекулярной массы, где последняя зависит только от отношений концентраций:

$$(c_d - c_m)/c_0 = M(1 - \bar{V}_2 \rho) \omega^2 (x_d^2 - x_m^2)/2RT \quad (11.52)$$

На практике при использовании уравнения (11.49) или (11.52) возникают осложнения, связанные с трудностями измерения фактической концентрации в ультрацентрифуге. Некоторые оптические методы дают только производную c_2 либо такую величину, которая лишь косвенно связана с c_2 , т.е. они не обеспечивают измерение абсолютной концентрации растворенного вещества в любом месте ячейки. Хотя уравнения (11.49) и (11.52) включают лишь отношения концентраций, однако эти отношения нельзя рассчитать, не зная абсолютной концентрации где-либо в ячейке, которая могла бы служить стандартом сравнения.

Один из способов преодоления трудностей, связанных с определением концентраций, состоит в следующем: равновесное центрифугирование проводят при достаточно больших скоростях ротора, так чтобы в области мениска совсем не оставалось растворенного вещества. Такой подход (известный как метод Ифантиса, или метод отрыва вещества от мениска) позволяет использовать область мениска в качестве точки отсчета при измерении концентрации оптическими методами.

Если провести опыт при соблюдении всех необходимых условий, то с помощью равновесного центрифугирования можно определить молекулярную массу вещества достаточно точно; в табл. 11.2 приведены некоторые иллюстративные данные, из которых следует, что среди разных методов равновесное центрифугирование по совокупности данных является наиболее точным методом.

РАВНОВЕСНОЕ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ СМЕСЕЙ МАКРОМОЛЕКУЛ

Предположим, что раствор не является гомогенным, а представляет собой смесь, состоящую из i компонентов. В таких случаях графики зависимости $\ln c_2$ от x^2 имеют вид кривых. Если концентрация материала с молекулярной массой M_i равна c_i , то уравнение (11.49) приобретает вид

$$c_n(x) = \sum_i c_i(x) = \sum_i c_i(x_0) \exp[M_i(1 - \bar{V}_{2i} \rho) \omega^2 (x^2 - x_0^2)/2RT] \quad (11.53)$$

где $\bar{V}_{2i}$ — парциальный удельный объем i -го компонента, а c_n — полная весовая концентрация растворенного вещества. В принципе можно подобрать такую функцию и найти величины $M(1 - \bar{V}_2 \rho)$ для всех компонентов. Но при этом необходима высокая точность измерений, на практике же редко достигается точность, при которой могла бы быть оправдана подобная аппроксимация, если в смеси присутствует более двух компонентов. Для веществ с близкими значениями молекулярных масс с помощью такого подгоночного метода невозможно получить достаточно хорошее разрешение.

Часто приходится довольствоваться средними значениями молекулярных масс. Если парциальный удельный объем одинаков для всех компонентов, то, продифференцировав обе части равенства (11.53), получим

$$\begin{aligned} d[\ln c_n(x)] dx^2 &= [(1 - \bar{V}_2\rho)\omega^2 2RT] \left[\frac{\sum_i M_i c_i(x)}{\sum_i c_i(x)} \right] \equiv \\ &\equiv [(1 - \bar{V}_2\rho)\omega^2 2RT] \bar{M}_w(x) \end{aligned} \quad (11.54)$$

Среднее значение молекулярной массы $\bar{M}_w(x)$, которое дает уравнение (11.54), является результатом усреднения по массам, поскольку c_n и c_i — весовые концентрации (см. Дополнение 11.3). Уравнение (11.54) позволяет определять средневесовое значение молекулярной массы $\bar{M}_w(x)$ в произвольной точке x ячейки. Величина $\bar{M}_w(x)$ должна возрастать с увеличением x , потому что тяжелые молекулы при равновесии в среднем окажутся дальше от оси вращения, нежели легкие.

Часто требуется определить среднюю молекулярную массу по всему препарату. Можно получить эту величину, интегрируя равенство (11.54) в пределах от мениска до дна ячейки, но проще это сделать другим путем. Взяв за основу уравнение (11.52), для смеси компонентов можно написать

$$\sum_i c_{id} - \sum_i c_{im} = \sum_i c_{i0} M_i (1 - \bar{V}_2\rho)\omega^2 (x_d^2 - x_m^2)/2RT \quad (11.55)$$

где c_{id} и c_{im} — равновесные концентрации i -го компонента у дна и в области мениска соответственно, а c_{i0} — начальная концентрация i -го компонента. Поделив обе части этого уравнения на $\sum_i c_{i0} = c_{n,0}$ и учитывая то, что две суммы, стоящие в левой части уравнения, не что иное, как полные концентрации у дна и в области мениска при равновесии, получим

$$[c_n(x_d) - c_n(x_m)]/c_{n,0} = [(1 - \bar{V}_2\rho)\omega^2/2RT](x_d^2 - x_m^2) \bar{M}_w \quad (11.56)$$

где $\bar{M}_w$, очевидно, средневесовое значение молекулярной массы для всей смеси. (Часто его называют средним по ячейке $\bar{M}_w$.)

С помощью нной обработки данных можно получить другие средние значения молекулярных масс. Среднечисленную молекулярную массу с помощью центрифугирования получить трудно, но на основе полученных данных можно рассчитать ее z -среднее значение для произвольной координаты x внутри ячейки (см. Дополнение 11.3). Можно показать, что

$$\begin{aligned} \bar{M}_z(x) &= \frac{\sum_i M_i^2 c_i}{\sum_i M_i c_i} = \\ &= [2RT/(1 - \bar{V}_2\rho)\omega^2] \{d\{\ln [c_n(x)\bar{M}_w(x)]\}/dx^2\} \end{aligned} \quad (11.57)$$

Тогда среднюю по ячейке $\bar{M}_z$ получают, интегрируя это равенство вдоль всей ячейки от мениска до дна. Уравнения (11.54) и (11.57) дают чувствительный критерий для проверки вещества на гомогениость. В случае единственного беспримесного компонента, не обладающего склонности к агрегированию, величины $\bar{M}_z(x)$ и $\bar{M}_w(x)$ должны совпадать при любом значении x в ячейке.

Дополнение 11.3

СРЕДНИЕ ЗНАЧЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС

Рассмотрим препарат, в котором имеется некоторое распределение растворенного вещества по сортам с разными молекулярными массами. Пусть $n(M)dM$ — число молей тех молекул данного вещества, молекулярная масса которых лежит в пределах от M до $M + dM$. Суммарное число всех молей этого вещества

$$n_{\text{сумм}} = \int_0^{\infty} dM n(M)$$

Функция $n(M)$ называется функцией распределения по молекулярным массам. Если бы нам был известен ее вид, мы имели бы полное описание всех сортов данного вещества в препарате. Сплошь и рядом, однако, из соображений удобства или по необходимости приходится иметь дело с менее точным описанием. Мы можем, например, определить моменты функции распределения $n(M)$; k -й момент этой функции равен

$$m_k = \int_0^{\infty} dM n(M) M^k$$

Таким образом, $n_{\text{сумм}}$ — нулевой момент; на графике это просто площадь под кривой функции распределения.

Средние значения молекулярных масс определяются как отношение некоторого k -го момента $n(M)$ более высокого порядка k ($k - 1$)-му моменту. Среднечисленная молекулярная масса определяется как

$$\bar{M}_n \equiv m_1/m_0 = \int_0^{\infty} dM n(M) M / \int_0^{\infty} dM n(M)$$

В случае дискретного распределения вещества по фракциям, каждая из которых содержит n_i молей компонента с молекулярной массой M_i , можно представить выражение для $\bar{M}_n$ в виде

$$\bar{M}_n = \left(\sum_i n_i M_i \right) / \sum_i n_i$$

Можно выразить $\bar{M}_n$ через молярные концентрации, попросту поделив и числитель и знаменатель на объем V препарата:

$$\bar{M}_n = \left[\left(\sum_i n_i M_i \right) / V \right] / \left[\left(\sum_i n_i \right) / V \right]$$

Весовая концентрация в гидродинамике измеряется в г/см³, отсюда $c_i = n_i M_i / V$. Таким образом, можно записать для среднечисленной молекулярной массы

$$\bar{M}_n = \left(\sum_i c_i \right) / \sum_i (c_i / M_i)$$

Средневесовая молекулярная масса определяется как отношение второго момента функции распределения к первому моменту:

$$\bar{M}_w \equiv m_2/m_1 = \left(\sum_i n_i M_i^2 \right) / \sum_i n_i M_i$$

Вводя, как и раньше, весовые концентрации, мы можем написать

$$\bar{M}_w = \left(\sum_i c_i M_i \right) / \sum_i c_i$$

Так как $\sum_i c_i$ — это полная весовая концентрация (c_n), каждый член в выражении для $\bar{M}_w$ просто равен весовой доле w_i в препарате фракции с молекулярной массой M_i .

Третье часто используемое среднее значение молекулярной массы — z -средняя молекулярная масса

$$\bar{M}_z \equiv m_3/m_2 = \left(\sum_i n_i M_i^3 \right) / \left(\sum_i n_i M_i^2 \right) = \left(\sum_i c_i M_i^2 \right) / \left(\sum_i c_i M_i \right)$$

Для смеси компонентов, молекулярные массы которых сильно различаются, величины $\bar{M}_n$, $\bar{M}_w$ и $\bar{M}_z$ весьма различны. Рассмотрим смесь, содержащую макромолекулы двух видов в весовом отношении 1:1; для одного вида молекулярная масса равна 10^3 , а для другого — 10^5 . Получающиеся при этом средние значения таковы:

$$\bar{M}_n = (1 + 1) / [(1/10^3) + (1/10^5)] = 1950$$

$$\bar{M}_w = [(1 \cdot 10^3) + (1 \cdot 10^5)] / (1 + 1) = 50\,500$$

$$\bar{M}_z = \{[1 \cdot (10^3)^2] + [1 \cdot (10^5)^2]\} / [(1 \cdot 10^3) + (1 \cdot 10^5)] = 99\,020$$

При использовании различных экспериментальных методов молекулярные массы усредняются по-разному. Поэтому, определив опытным путем два или более средних значения, крайне просто установить, является ли изучаемый препарат смесью или нет. С помощью ультрацентрифугирования можно определить $\bar{M}_w$ и $\bar{M}_z$. Светорассеяние дает $\bar{M}_w$ (гл. 14). Для прямых измерений $\bar{M}_n$ следует обратиться к таким методам, как измерение осмотического давления или давления насыщенных паров.

ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ РАВНОВЕСНОЙ СИСТЕМЫ МОНОМЕР—ДИМЕР

Предположим, что мы имеем дело с системой взаимодействующих макромолекул. Все ее компоненты должны находиться в состоянии равновесия в каждой точке внутри ячейки для центрифугирования. Если парциальный удельный объем не меняется в результате связывания, то константа равновесия не отличается от той, которая была в невозмущенном седиментацией препарате. Однако равновесие будет сдвигаться с изменением давления, если при этом происходит изменение молекулярных объемов. Давления, возникающие при центрифугировании, могут быть весьма велики. Градиент давления в ячейке $dP/dx = -\rho\omega^2 x$; отсюда $P(x) = (\rho/2)\omega^2(x^2 - x_M^2)$. Давление на дне ячейки может достигать нескольких сот атмосфер.

Для простоты рассмотрим равновесие в системе мономер—димер, $2P \rightleftharpoons P_2$, характеризуемое константой равновесия

$$\hat{k} = c_2/c_1^2 \quad (11.58)$$

Эффектами, связанными с изменением давления, пренебрежем, т.е. будем считать, что $\bar{V}_2$ одинаков у всех взаимодействующих компонентов. Так как мы пользуемся весовыми единицами измерения, $\hat{k}$ отличается от обычной константы равновесия в $2/M_1$ раз, где M_1 — молекулярная масса мономера.

Сначала покажем, что это соотношение, характеризующее равновесие, выполняется в любой точке x в ячейке. Предположим, что у нас есть смесь мономера с димером, которые не взаимодействуют друг с другом. Распределение внутри ячейки для каждого отдельного компонента получим по формуле (11.49):

$$c_1(x) = c_1(x_0) \exp\{[M_1(1 - \bar{V}_2\rho)\omega^2/2RT](x^2 - x_0^2)\} \quad (11.58a)$$

$$c_2(x) = c_2(x_0) \exp\{[2M_1(1 - \bar{V}_2\rho)\omega^2/2RT](x^2 - x_0^2)\} \quad (11.58b)$$

Поделив одно равенство на другое, получим

$$c_2(x)/c_1(x) = [c_2(x_0)/c_1(x_0)] \exp\{[M_1(1 - \bar{V}_2\rho)\omega^2/2RT](x^2 - x_0^2)\} \quad (11.58в)$$

Экспоненциальный множитель здесь — это просто $c_1(x)/c_1(x_0)$, и мы получаем в результате следующее равенство:

$$c_2(x)/c_1^2(x) = c_2(x_0)/c_1^2(x_0) \quad (11.58г)$$

Это отношение не зависит от скорости вращения ротора ω и от координаты x в ячейке. Таким образом, если мы поместим в ячейку для центрифугирования смесь мономер—димер, которая находится в состоянии равновесия, так что в начале опыта выполняется соотношение (11.58), то равновесное распределение сохранится при любой скорости в любой точке внутри ячейки.

Во время центрифугирования мы не имеем возможности отдельно наблюдать мономер и димер, а можем регистрировать только полную весовую концентрацию c_n , описываемую уравнением (11.53). Один из способов получения константы равновесия состоит в следующем. Полная весовая концентрация равновесной смеси составляет

$$c_n = c_1 + c_2 = c_1 + \hat{k}c_1^2 \quad (11.59)$$

Нам понадобится дифференциальная форма равенства (11.59):

$$dc_n/dc_1 = 1 + 2\hat{k}c_1 \quad (11.60)$$

Из-за наличия взаимодействий в системе средневесовая молекулярная масса в любом месте внутри ячейки зависит теперь также и от c_n :

$$\bar{M}_w(c_n) = (M_1c_1 + 2M_1c_1^2\hat{k})/c_n = [M_1c_1(1 + 2c_1\hat{k})]/c_n \quad (11.61)$$

Обращая производную в формуле (11.60) и воспользовавшись уравнением (11.61), чтобы выразить с его помощью множитель $1 + 2c_1\hat{k}$, мы можем написать

$$dc_1/dc_n = 1/(1 + 2c_1\hat{k}) = (c_1/c_n)[M_1/\bar{M}_w(c_n)] = w_1M_1/\bar{M}_w(c_n) \quad (11.62)$$

где $w_1 = c_1/c_n$ — весовая доля мономера. Продифференцировав это соотношение, определяющее w_1 , получим несколько иное выражение для dc_1/dc_n :

$$dc_1/dc_n = w_1 + c_n(dw_1/dc_n) \quad (11.63)$$

Приравняв оба выражения из формул (11.62) и (11.63) друг другу, после преобразований получим

$$d(\ln w_1)/d(\ln c_n) = [M_1/\bar{M}_w(c_n)] - 1 \quad (11.64)$$

Можно проинтегрировать равенство (11.64) на отрезке между двумя точками в ячейке, x_0 и x :

$$\ln[w_1(x)/w_1(x_0)] = \int_{c_n(x_0)}^{c_n(x)} \{[M_1/\bar{M}_w(c_n)] - 1\}(dc_n/c_n) \quad (11.65)$$

Для того чтобы мы могли использовать это уравнение, нужно, чтобы полученные данные захватывали область столь низких концентраций, что $c_n(x_0) \cong 0$. Тогда $w_1(x_0) = 1$. Мы можем получить $c_n(x)$ непосредственно из опыта по равновесному центрифугированию, а $\bar{M}_w(x)$ — с помощью уравнения (11.54), после чего нетрудно рассчитать $\bar{M}_w(c_n)$. Таким образом, если известна M_1 из независимых источников, можно получить $\ln w_1$ для любого значения x в ячейке графическим интегрированием зависимости $\{[M_1/\bar{M}_w(c_n)] - 1\} c_n^{-1}$ от

c_n . Далее константу равновесия можно вычислить по формуле

$$\hat{k} = (1 - w_1)/w_1^2 c_n \quad (11.66)$$

В более сложных случаях равновесия требуются более сложные расчеты, но в итоге получаются аналогичные результаты. Равновесное центрифугирование представляет собой отличный метод исследования макромолекулярных комплексов. В реальных случаях, однако, приходится пользоваться более сложными уравнениями, чем уравнение (11.65), в которых учитывается поправка на неидеальность.

АНАЛИЗ ПРИБЛИЖЕНИЯ К РАВНОВЕСИЮ

Равновесное центрифугирование — чрезвычайно эффективный метод, но проведение измерений занимает очень много времени. Даже при небольшой высоте столба жидкости для установления равновесного распределения вещества с мол. массой 500 000 требуется день или два, а для вещества с мол. массой 50 000 — несколько часов. Многие исследователи предпочитают пользоваться результатами анализа низкоскоростных седиментационных измерений, не дожидаясь установления равновесия. Такого рода данные представлены на рис. 11.18 в промежуточные моменты времени. В 1947 г. Арчибальд, который много лет занимался поисками решений уравнения Ламма, заметил, что в области мениска и у дна ячейки уравнение потока имеет тривиальное решение для любого момента времени в течение всего седиментационного опыта. У мениска и на дне ячейки J_2 должен быть равен нулю, потому что через эти поверхности не может происходить переноса вещества. Данный эффект не представляет интереса при больших скоростях ротора, так как в этом случае у мениска вообще не оказывается вещества, а на дне образуется плотный осадок. При малых скоростях, однако, приравняв нулю выражение для J_2 [уравнение (11.4)], имеем

$$\omega^2 s/D = (\partial c_2/\partial x)(1/x c_2) \quad (11.67)$$

только для $x = x_d$ или $x = x_m$.

Подставляя выражения для s и D , можно записать

$$M_m = [RT/(1 - \bar{V}_2 \rho) \omega^2] (\partial c_2/\partial x)_{x_m} (1/x_m c_m) \quad (11.68a)$$

$$M_d = [RT/(1 - \bar{V}_2 \rho) \omega^2] (\partial c_2/\partial x)_{x_d} (1/x_d c_d) \quad (11.68b)$$

где c_m и c_d — концентрации соответственно у мениска и у дна. С помощью этих формул можно получить две оценки макромолекулярной массы для любого момента времени, если мы сумеем измерить концентрацию растворенного вещества и градиент его концентрации вверх и вниз. Для гомогенного вещества оба значения молекулярных масс должны совпадать. Таким образом, метод Арчибальда — хороший тест на гомогенность препарата.

Трудность использования уравнений (11.68) заключается в трудности измерения одновременно и концентраций, и градиентов. Если мы воспользуемся абсорбционной оптикой, то получим концентрации, которые приходится дифференцировать с помощью численных методов, чтобы получить градиенты. Такая процедура увеличивает погрешности экспериментальной зависимости концентрации от расстояния, что отразится на точности измерений. Здесь более пригодна шлирен-оптика, позволяющая осуществлять прямые измерения градиента. Тот факт, что в ячейке сохраняется область плато, упрощает расчет концентраций у дна и у мениска по данным, полученным с помощью шлирен-системы. Мы всегда можем написать

$$c_m = c_n - \int_{x_m}^{x_n} (\partial c/\partial x) dx \quad (11.69a)$$

$$c_d = c_n + \int_{x_n}^{x_d} (\partial c / \partial x) dx \quad (11.696)$$

Учитывая весь материал между x_m и x_n или между x_n и x_d и используя принцип сохранения массы, можно показать, что

$$c_m = c_0 - (1/x_m^2) \int_{x_m}^{x_n} x^2 (\partial c / \partial x) dx \quad (11.70a)$$

$$c_d = c_0 + (1/x_d^2) \int_{x_n}^{x_d} x^2 (\partial c / \partial x) dx \quad (11.70b)$$

где c_0 — начальная равномерная концентрация растворенного вещества. При отсутствии плато можно воспользоваться более сложными способами расчета (см. Schachman, 1959). Любой из этих методов для случая переходного состояния дает возможность быстро определить величину молекулярной массы.

ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ В ГРАДИЕНТЕ ПЛОТНОСТИ: УПРОЩЕННАЯ ТЕОРИЯ

Предположим, что концентрированный раствор низкомолекулярного вещества центрифугируют при больших скоростях до тех пор, пока не установится равновесие. Согласно уравнению (11.49), малые молекулы растворенного вещества (компонент 3) перераспределяются в ячейке точно так же, как и большие. Используя мениск в качестве точки отсчета и разлагая в ряд экспоненту в уравнении (11.49) ввиду малости M , получим

$$c_3(x)/c_3(x_m) = 1 + [M_3(1 - \bar{V}_3\rho)\omega^2/2RT](x^2 - x_m^2) \quad (11.71)$$

Это приближенная формула, так как в концентрированном растворе ρ зависит от x , и эффектами неидеальности здесь пренебречь нельзя. Вообще следовало бы начать с того, что и уравнение (11.49) является приближенным. Но не обращая пока внимания на эти осложнения, видим, что уравнение (11.71) предсказывает параболическое распределение концентрации растворенного вещества. Это означает, что при равновесии устанавливается градиент плотности. Согласно уравнению (11.71), $\partial\rho/\partial x \propto \partial c_3/\partial x \propto \omega^2 x$. На практике, используя соли тяжелых металлов типа CsCl, можно создать градиент с перепадом плотности более чем 10% в обыкновенной пробирке для центрифугирования при максимальных скоростях современных ультрацентрифуг.

Теперь посмотрим, что получится, если перед началом центрифугирования добавить небольшое количество макромолекул в солевой раствор. Если плотность макромолекул (компонент 2) превышает максимальную плотность CsCl в основании градиента, то они образуют осадок на дне пробирки. Если их плотность меньше минимальной плотности CsCl, то они всплывут на поверхность. Если же их плотность попадает в диапазон изменения градиента, то они соберутся в зоне, где плотность такова, что коэффициент $(1 - \bar{V}_2\rho)$ равен нулю (рис. 11.19). Зная распределение плотности вдоль пробирки, можно определить плотность (а тем самым и $\bar{V}_2$) макромолекул по их положению в ячейке. В центре зоны $\bar{V}_2^{-1}$ просто равен плотности ρ_0 раствора в данной точке. Эта плотность называется плавучей плотностью. Описанным способом можно разделить в препаративной центрифуге смесь макромолекул разной плотности. Казалось бы, разрешающая способность метода должна быть очень высокой, так как в принципе можно создать весьма пологий градиент плотности. Поэтому нам важно знать, какие факторы определяют ширину зоны, содержащей макромолекулы.

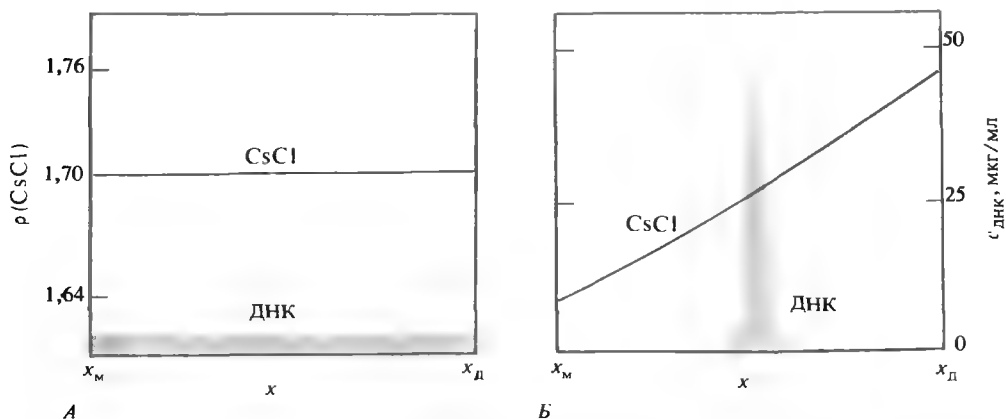


РИС. 11.19. Равновесное центрифугирование малого количества ДНК в градиенте CsCl. А. Распределение плотности в начале опыта. Б. Распределение плотности после установления равновесия. (Szybalski, Fractions, Beckman Instruments, Inc., no. 1, p. 1, 1968.)

Пренебрегая и далее термодинамическими эффектами трехкомпонентности, рассмотрим чисто физический градиент плотности. В области, где находятся макромолекулы, мы можем представить плотность в виде ряда Тэйлора:

$$\rho(x) = \rho_0 + (x - x_0)(d\rho/dx)_{x_0} \quad (11.72)$$

где x_0 — положение центра равновесной зоны, в которой собраны макромолекулы. Подставим это выражение в уравнение (11.48), определяющее равновесное распределение макромолекул. Пренебрегая поправками на неидеальность, получим

$$M_2(1 - \bar{V}_2)\{\rho_0 + (x - x_0)(d\rho/dx)_{x_0}\}x = (RT'\omega^2)(1/c_2)(dc_2/dx) \quad (11.73)$$

Это уравнение можно упростить, если учесть, что $\bar{V}_2\rho_0 = 1$. Введя $y = x - x_0$ и $dy = dx$, мы можем переписать уравнение (11.73) в виде

$$d(\ln c_2) = (-M_2\omega^2/RT)(d\rho/dx)_{x_0}\bar{V}_2(y^2 + x_0y)dy \quad (11.74)$$

Поскольку y много меньше x_0 , член с y^2 можно опустить. Интегрируя от $y = 0$ до $y = x$ и заменяя y на $x - x_0$, получим

$$c_2(x) = c_2(x_0) \exp[-(x - x_0)^2/2\sigma^2] \quad (11.75)$$

Таким образом, распределение макромолекул в градиенте плотности имеет гауссову форму с шириной зоны, характеризуемой величиной стандартного отклонения σ , которая определяется по формуле

$$\sigma^2 = RT/M_2\bar{V}_2c_2^2x_0(d\rho/dx)_{x_0} \quad (11.76)$$

● ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ В ГРАДИЕНТЕ ПЛОТНОСТИ: ТРЕХКОМПОНЕНТНАЯ ТЕОРИЯ

Для того чтобы правильно решить задачу о равновесии в градиенте плотности, необходимо выразить в явной форме термодинамические соотношения, описывающие поведение всех трех компонентов. Молярная концентрация макромолекул достаточно велика, и ее

влияние приходится учитывать. Избирательное взаимодействие между компонентами 2 и 3 может изменить градиент плотности, форму распределения в зоне и значение кажущейся плавучей плотности (ρ_0). Это весьма сложная задача, и мы очертим ее здесь лишь приблизительно.

Начнем с общего феноменологического описания потока i -го компонента в трехкомпонентной системе [см. уравнение (10.38)]:

$$J_i = \sum_{j=1}^3 L_{ij} X_j \quad (11.77)$$

где X_j — обобщенная сила, действующая на компонент j . Во время центрифугирования, как мы знаем [из сопоставления уравнений (11.77) и (11.29)], сила, действующая на j -й компонент, равна

$$X_j = \omega^2 x - \partial \hat{\mu}_j / \partial x \quad (11.78)$$

При наличии механического и теплового равновесия эти силы должны быть равны нулю. Следовательно,

$$\omega^2 x = \partial \hat{\mu}_j / \partial x \quad (11.79a)$$

Градиент химического потенциала компонента j можно найти тем же путем, каким это было сделано ранее в случае двухкомпонентной системы [уравнения (11.30) и (11.31)]. В результате уравнение (11.79a) можно переписать в следующем виде:

$$(1 - \bar{V}_j \rho) \omega^2 x = \sum_{i=1}^3 (\partial \hat{\mu}_j / \partial c_i) (\partial c_i / \partial x) \quad (11.79b)$$

При центрифугировании в градиенте плотности третий компонент присутствует в виде концентрированного раствора тяжелой соли типа CsCl. Найдем сначала выражение для градиента плотности, создаваемого этим компонентом. Такой градиент может возникнуть из-за изменения концентрации и за счет давления:

$$d\rho/dx = (\partial \rho_C / \partial x) + (\partial \rho_P / \partial x) \quad (11.80)$$

Будем считать, что химический потенциал компонента 3 не зависит от концентраций компонентов 1 и 2, тогда

$$(1 - \bar{V}_3 \rho) \omega^2 x = (\partial \hat{\mu}_3 / \partial c_3) \rho (\partial c_3 / \partial x) \quad (11.81)$$

Пользуясь уравнением (11.81), можно выразить градиент плотности, создаваемый за счет количественного содержания компонента 3 (низкомолекулярного растворенного вещества типа соли), как

$$\partial \rho_C / \partial x = (\partial \rho / \partial \hat{\mu}_3) (\partial \hat{\mu}_3 / \partial c_3) (\partial c_3 / \partial x) = g \omega^2 x \quad (11.82)$$

где постоянная $g = (1 - \bar{V}_3 \rho) (\partial \rho / \partial \hat{\mu}_3)$. Производную $\partial \rho / \partial \hat{\mu}_3$ можно определить, измеряя зависимость плотности от активности компонента 3. Существует также градиент плотности за счет сжатия:

$$\partial \rho_P / \partial x = (\partial \rho / \partial P) (\partial P / \partial x) = k \omega^2 x \quad (11.83)$$

где $k = \partial \rho / \partial P$ — еще одна постоянная. Полный градиент плотности получим при суммировании обоих эффектов [согласно уравнению (11.80)]:

$$d\rho/dx = (k + g) \omega^2 x \quad (11.84)$$

Вычислим далее, какое положение занимает зона, содержащая макромолекулы. В трехкомпонентной системе третий компонент не обязательно должен присутствовать в фор-

мулах в явном виде, поскольку в такой системе имеется только два независимых химических потенциала (см. также Дополнение 10.1). Удобнее исключить из рассмотрения соль и далее иметь дело только с растворителем и макромолекулами. Теперь, однако, компоненты 1 (вода) и 2 (макромолекулы) необходимо описывать термодинамическими соотношениями, куда входят оба компонента. Система уравнений (11.79б) приобретает вид

$$(1 - \bar{V}_1 \rho) \omega^2 x = (\partial \hat{\mu}_1 / \partial c_1)_{c_2} (\partial c_1 / \partial x) + (\partial \hat{\mu}_1 / \partial c_2)_{c_1} (\partial c_2 / \partial x) \quad (11.85a)$$

$$(1 - \bar{V}_2 \rho) \omega^2 x = (\partial \hat{\mu}_2 / \partial c_2)_{c_1} (\partial c_2 / \partial x) + (\partial \hat{\mu}_2 / \partial c_1)_{c_2} (\partial c_1 / \partial x) \quad (11.85б)$$

где явно выражен тот факт, что концентрация компонента 2 теперь может влиять на химический потенциал компонента 1 и наоборот.

Затруднения, возникающие при решении уравнений (11.85), заключаются в трудности учета взаимных влияний $(\partial \hat{\mu}_1 / \partial c_2)_{c_1}$ и $(\partial \hat{\mu}_2 / \partial c_1)_{c_2}$. Однако поскольку химический потенциал компонента 1 является функцией концентраций обоих компонентов, его изменение в результате изменений в составе раствора можно представить как

$$d\hat{\mu}_1 = (\partial \hat{\mu}_1 / \partial c_1)_{c_2} dc_1 + (\partial \hat{\mu}_1 / \partial c_2)_{c_1} dc_2 \quad (11.86)$$

Изменяя содержание в растворе компонента 1 при постоянном $\hat{\mu}_1$, получим

$$0 = (\partial \hat{\mu}_1 / \partial c_1)_{c_2} (\partial c_1 / \partial c_1)_{\hat{\mu}_1} + (\partial \hat{\mu}_1 / \partial c_2)_{c_1} (\partial c_2 / \partial c_1)_{\hat{\mu}_1} \quad (11.87)$$

Преобразовав это соотношение, мы можем определить с его помощью коэффициент сольватации

$$\Gamma' = (\partial c_1 / \partial c_2)_{\hat{\mu}_1} = -(\partial \hat{\mu}_1 / \partial c_2)_{c_1} / (\partial \hat{\mu}_1 / \partial c_1)_{c_2} \quad (11.88)$$

Этот параметр представляет собой величину, численно равную количеству растворителя в граммах, которым необходимо скомпенсировать введение в раствор 1 г макромолекул при сохранении сильной разбавленности раствора, чтобы химический потенциал раствора не изменился. Он является, таким образом, мерой количества связанного растворителя.

Коэффициент Γ' — не что иное, как трехкомпонентный эквивалент измеряемой в граммах на грамм степени гидратации (δ_1) , которая встречалась ранее. Используя равенство (11.88), мы можем решить уравнения (11.85) следующим образом. Заметим сначала, что $(\partial \hat{\mu}_2 / \partial c_1) = (\partial \hat{\mu}_1 / \partial c_2)$, так как обе эти величины равны $\partial^2 G / \partial c_1 \partial c_2$, где G — свободная энергия Гиббса¹⁾. Заменим $\partial \hat{\mu}_1 / \partial c_2$ на $-\Gamma' \partial \hat{\mu}_1 / \partial c_1$. Тогда мы сможем решить систему из уравнений (11.85a) и (11.85б), исключив оттуда неизвестные величины $(\partial \hat{\mu}_1 / \partial c_1)_{c_2}$ и $\partial c_1 / \partial x$. После довольно громоздких преобразований в конце концов получаем уравнение, аналогичное по форме уравнению (11.81):

$$(1 + \Gamma') \{1 - [(\bar{V}_2 + \Gamma' \bar{V}_1) / (1 + \Gamma')]\rho\} \omega^2 x = (\partial \hat{\mu}_2 / \partial c_2)_{c_1} (\partial c_2 / \partial x) \quad (11.89)$$

При равновесии в градиенте плотности величина плавучей плотности ρ_0 определяет в растворе ту точку, где концентрация макромолекул максимальна, т.е. в этой точке $\partial c_2 / \partial x = 0$ и

$$1/\rho_0 = (\bar{V}_2 + \Gamma' \bar{V}_1) / (1 + \Gamma') \equiv \bar{V}_c \quad (11.90)$$

где мы определили парциальный удельный объем $\bar{V}_c$ макромолекулы с учетом сольватации как величину, обратную плавучей плотности.

Уравнение (11.89) можно представить в более привычной форме, если вспомнить, что

¹⁾ В отечественной литературе эту величину называют термодинамическим потенциалом и обозначают также символом Φ . — Прим. ред.

$$(\partial \hat{\mu}_2 / \partial c_2)_{c_1} = (RT/M_2) [\partial (\ln a_2) / \partial c_2] = (RT/M_2 c_2) \{1 + [\partial (\ln \hat{\gamma}_2) / \partial (\ln c_2)]\} \quad (11.91)$$

Таким образом, мы можем написать

$$M_2(1 + \Gamma')(1 - \bar{V}_c \rho) \omega^2 x / [1 + \partial (\ln \hat{\gamma}_2) / \partial (\ln c_2)] = (RT/c_2) (\partial c_2 / \partial x) \quad (11.92)$$

Сравнивая уравнения (11.92) и (11.48), мы видим, что величина, которая входит как кажущаяся молекулярная масса в уравнение (11.92), представляет собой молекулярную массу с учетом сольватации: $M_c = M_2(1 + \Gamma')$.

Величины $\bar{V}_c$ и M_c , учитывающие сольватацию, зависят от плотности раствора, так как концентрация растворенного вещества (а значит, и сольватация) меняется от точки к точке вдоль градиента. Поэтому эффективный градиент плотности $(\partial \rho / \partial x)^{\text{эфф}}$ должен включать физический градиент [уравнение (11.84)] с поправкой на этот эффект. Разумно предположить, что присутствие макромолекул искажает градиент из-за их взаимодействия с растворителем. С учетом всех этих факторов (включая неидеальность раствора с макромолекулами) можно получить уравнение, описывающее, подобно уравнению (11.75), гауссово распределение, ширина которого σ вычисляется по формуле

$$\sigma^2 = RT/M_c^{\text{каж}}(x_0) \bar{V}_c(x_0) (\partial \rho / \partial x)_{x_0}^{\text{эфф}} \omega^2 x_0 \quad (11.93)$$

где кажущаяся молекулярная масса с учетом сольватации связана с истинной молекулярной массой M_c сольватированной макромолекулы (частицы) соотношением, включающим вириальное разложение:

$$M_c^{\text{каж}} = M_c [1 + 2B_2 c_2(x_0) + \dots]^{-1}, \quad (11.94)$$

где B_2 — константа.

Дополнение 11.4

СЕДИМЕНТАЦИЯ В ТРЕХКОМПОНЕНТНЫХ СИСТЕМАХ

Касасса и Эйзенберг разработали полезный способ определения молекулярной массы растворенного вещества в трехкомпонентной системе, для которого не являются помехой эффекты трехкомпонентности типа избирательной сольватации. Здесь мы лишь кратко изложим результаты, подробный вывод можно найти у Фузиты (Fujita, 1975).

Касасса и Эйзенберг показали, что в предельном случае низких концентраций макромолекул ($c_2 \rightarrow 0$) величины, входящие в левую часть уравнения (11.89), можно найти из соотношения

$$(1 + \Gamma') \{1 - [(\bar{V}_2 + \Gamma' \bar{V}_1) / (1 + \Gamma')]\rho\} = (\partial \rho / \partial c_2)_{\hat{\mu}_1, \hat{\mu}_3}$$

На практике величину, стоящую в правой части, находят путем диализа раствора, содержащего макромолекулы и соль, против большого объема солевого раствора с последующим измерением плотности раствора с макромолекулами после установления равновесия. Тогда результаты равновесного центрифугирования можно оценить с помощью уравнения (11.92), опустив члены, учитывающие поправку на неидеальность, так как $c_2 \rightarrow 0$:

$$d(\ln c_2) / d(x^2) = (M_2 \omega^2 / 2RT) (\bar{c} \rho / \bar{c} c_2)_{\hat{\mu}_1, \hat{\mu}_3}$$

Аналогичным образом сохраняется возможность анализа опытов по скоростной седиментации после замены коэффициента $1 - \bar{V}_2 \rho$ в уравнении (11.28) на его трехкомпонентный эквивалент: $(\partial \rho / \partial c_2)_{\hat{\mu}_1, \hat{\mu}_3}$.

Из всего вышесказанного должно быть ясно, что практическое использование уравнений (11.90) и (11.93) для определения абсолютных значений молекулярных масс и плотностей наталкивается на значительные трудности. Принято пользоваться уравнением (11.84) для оценки $(\partial\rho/\partial x)^{\text{эфф}}$, поскольку все присутствующие в этом уравнении величины поддаются измерению. Макромолекулы с известным или предположительным значением ρ_0 помещают в градиент, и исследуемые макромолекулы сравнивают со стандартом по их относительному расположению в градиенте. При необходимости более точных измерений можно экспериментально определить $(\partial\rho/\partial x)^{\text{эфф}}$, используя изотопное замещение в препарате, например ^{15}N -ДНК на фоне ^{14}N -ДНК. В этом случае предполагают, что указанное изотопное замещение не влияет на значение термодинамических величин, а лишь изменяет величину молекулярной массы безводной формы вещества и плотность макромолекулы. Зная $(\partial\rho/\partial x)^{\text{эфф}}$, по ширине концентрационного распределения в зоне с помощью формулы (11.93) получим точное значение молекулярной массы.

Отметим, что рассуждения, приводящие нас к уравнению (11.92), пригодны для любой трехкомпонентной системы независимо от того, насколько сильно меняется плотность раствора в присутствии третьего компонента. Может показаться, что подобная чувствительность к наличию других компонентов серьезно осложнит проведение любых седиментационных опытов. К счастью, существуют способы, позволяющие справиться с этими затруднениями (см. Дополнение 11.4).

Равновесное центрифугирование в градиенте плотности в ряде случаев применяли при работе с белками, но большая часть полученных данных относится к нуклеиновым кислотам. В гл. 22 приведены примеры применения этого метода.

Краткие выводы

В опытах по скоростной седиментации измеряют скорость, с которой макромолекула движется под действием радиального ускорения в ультрацентрифуге. Скорость s в единичном силовом поле прямо пропорциональна молекулярной массе и обратно пропорциональна коэффициенту трения. Отсюда следует, что для частиц сферической формы $s \propto M^{2/3}$. При центрифугировании каждый беспримесный компонент, как правило, образует границу. По одну сторону границы, ближе к мениску, компонент отсутствует; по другую сторону, в области плато, концентрация не меняется при переходе от точки к точке, но меняется с течением времени. Величину s можно определить по данным, полученным либо в области границы, либо в области плато. На форму границы влияет диффузия, но на практике зависимость s от концентрации приводит к тому, что форма границы в большой мере зависит еще и от концентрации. В системе, где присутствует несколько различных видов макромолекул, возникают очень сложные эффекты, которые сказываются на высоте и форме границы. Эти эффекты не мешают при зональном центрифугировании, когда перед началом опыта содержащий макромолекулы гомогенный раствор не занимает всего объема, а присутствует в виде тонкого слоя поверх растворителя. Стабилизирующие градиенты позволяют извлечь физически разделившиеся компоненты препарата после того, как пробирка с раствором вынута из центрифуги.

При скоростях ротора, много меньших, чем те, при которых проводят опыты по скоростной седиментации, в результате центрифугирования устанавливается равновесное распределение макромолекул. Форма этого распределения самым тесным образом связана с молекулярной массой и не зависит от фрикционных свойств молекулы. При наличии смеси компонентов с помощью равновесного центрифугирования получают средневесовое значение молекулярной массы. В ряде случаев можно проанализировать равновесное распределение взаимодействующих макромолекул и определить константу связывания. Равновесное центрифугирование в градиенте плотности является чрезвычайно эффектив-

ным методом разделения макромолекул на основе различий в плавучей плотности. Здесь равновесное распределение макромолекул устанавливается в градиенте тяжелой соли типа CsCl, когда область изменения плотности раствора включает внутри себя точку, соответствующую плотности макромолекул. По установлении равновесия макромолекулы оказываются в узкой зоне, в центре которой плотность равна плавучей плотности. Последняя не совпадает с плотностью собственно макромолекул из-за сложных термодинамических эффектов трехкомпонентности, проявляющихся в концентрированных солевых растворах, в которых обычно создается градиент. Ширина зоны, где сконцентрированы макромолекулы, обратно пропорциональна корню квадратному из значения молекулярной массы.

Задачи

11.1. Найдите скорость (в см/с), с которой медный шарик массой в 1 г (А) будет погружаться в водоем; (Б) будет двигаться в водном растворе при центрифугировании со скоростью 1 об/мин на расстоянии 10 см от оси вращения.

11.2. Предположим, что вы хотите определить коэффициент седиментации вещества, присутствующего в малой концентрации и загрязненного массой примесей. Вы, конечно же, не можете достоверно обнаружить это вещество оптическими методами в ультрацентрифуге. Однако вы можете оценить его количество каким-нибудь биохимическим способом, например «по числу крыс, убиваемых 1 см³ раствора». Вы воспользовались ячейкой с механическим разделением объема (рис. 11.20), в начале опыта заполненной раствором с концентрацией c_0 исследуемого вещества в единицах измерения биохимического теста. В момент времени t' после начала центрифугирования перегородка опускается вниз. (Считайте, что перемещение перегородки во время центрифугирования не вызывает перемешивания раствора.) В момент времени t , когда происходит торможение ротора, перегородка поднимается и занимает положение x_n (будем считать, что это происходит в области плато). Раствор, который находится выше перегородки, после этого перемешивается, и мы находим (опять посредством биохимического теста), что после перемешивания концентрация вещества стала c_n . Выведите формулу, которая позволит вычислить s , если из опыта известны ω , t , x_n , c_n и c_0 . *Указание:* все следует из принципа сохранения массы. (В настоящее время такой подход применяют при центрифугировании активного фермента; см. Cohen et al., 1967.)

11.3. Согласно данным, полученным с помощью электронного микроскопа, фермент стрэйтаса (гипотетический) представляет собой вытянутый эллипсоид вращения с отношением осей, равным 20. После титрования его избытком п-хлормеркурибензоата (ПХМБ) коэффициент седиментации уменьшился в 1,58 раза, хотя и до и после титрования наблюдается всего одна седиментирующая зона. Коэффициент диффузии увеличился после титрования в 2,52 раза.

а На сколько фрагментов распалась стрэйтаса под действием ПХМБ?

б. Рассчитайте величину отношения осей фрагментов.

в. Определите, какими, вероятнее всего, являются фрагменты — вытянутыми или сплюснутыми — и изобразите схематически вероятную структуру стрэйтасы.

11.4. У сферического белка с радиусом R (для безводной формы) коэффициент седиментации $s_{20,w} = 8S$. Предположим, что мы удалили сферическое ядро белка, заключенное в пределах от $r = 0$ до $r = R/2$, и заменили его растворителем. Как такая замена скажется на величине наблюдаемого $s_{20,w}$?

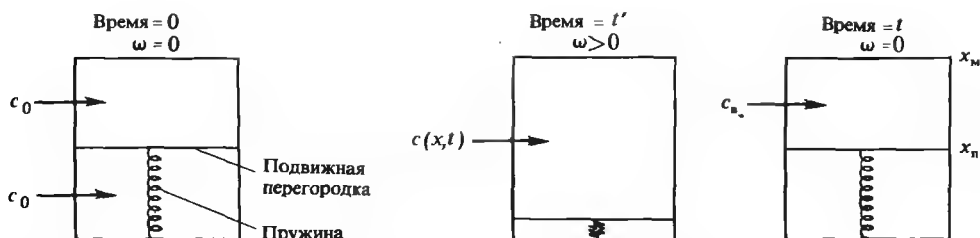


РИС. 11.20. Опыт с использованием ячейки с механическим разделением объема.

11.5. После того как белок поместили в чистую D_2O , молекулярная масса его в результате замещения протонов увеличилась на 1,55%. Пользуясь этими сведениями, покажите, что можно определить $\bar{V}_2$ из сопоставления данных по равновесному центрифугированию белка в D_2O и H_2O . Можно принять, что объемы молекулы белка в H_2O и в D_2O одинаковы.

ЛИТЕРАТУРА

Общая

- Freifelder D.*, 1976. *Physical Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, San Francisco (Фрайфельдер Д. Физическая биохимия. — М.: Мир, 1980.)
Fujita H., 1975. *Foundations of Ultracentrifugal Analysis*, Wiley, New York.
Schachman H. K., 1959. *Ultracentrifugation in Biochemistry*, Academic Press, New York.
Tanford C., 1961. *Physical Chemistry of Macromolecules*, Wiley, New York. (Тенфорд Ч. Физическая химия полимеров. — М.: Химия, 1965.)
Van Holde K. E., 1975. Sedimentation analysis of proteins. In: *The Proteins*, 3d ed., ed. H. Neurath and R. Hill, Academic Press, New York, 1, 228.

Специальная

- Adams E. T., Jr.* 1967. Analysis of self-association systems by sedimentation equilibrium experiments, *Fractions*, Beckman Instruments, Inc., no. 3, p.1.
Bloomfield V., Crothers D., Tinoco I., Jr., 1974. *Physical Chemistry of Nucleic Acids*, Harper & Row, New York.
Cann J. R., 1970. *Interacting Macromolecules: The Theory and Practice of Their Electrophoresis, Ultracentrifugation and Chromatography*, Academic Press, New York.
Cohen R., Giraud B., Messiah A., 1967. Theory and practice of analytical centrifugation of an active substrate-enzyme complex, *Biopolymers*, 5, 203.
Dishon M., Weiss G. H., Yphantis D. A., 1967. Numerical solutions of the Lamm equation, III: Velocity centrifugation, *Biopolymers*, 5, 697.
Eisenberg H., 1976. *Biological Macromolecules and Polyelectrolytes in Solution*, Clarendon Press, Oxford. (Полезное руководство, рассчитанное на подготовленного читателя.)
Hearst J. E., Schmid C. W., 1973. Density gradient sedimentation equilibrium. In: *Methods in Enzymology*, ed. C. H. W. Hirs and S. N. Timasheff, Academic Press, New York, 17, 111.
Hinton R., Dobrota M., 1976. *Density Gradient Centrifugation*, North-Holland, New York.
Kuntz I. D., Jr., Kauzmann W., 1974. Hydration of proteins and polypeptides. In: *Advances in Protein Chemistry*, ed. C.B. Anfinsen, J. T. Edsall and F. M. Richards, Academic Press, New York, 28, 239.
Van Holde K. E., 1971. *Physical Biochemistry*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J.

12.1. Вискозиметрия

В этой главе мы обратимся к некоторым другим методам получения информации о размерах и конформации биополимеров. Мы будем рассматривать эти методы далеко не так подробно, как ультрацентрифугирование, которому посвящена предыдущая глава. Одни из этих методов не применяются так часто, как ультрацентрифугирование, другие трудно интерпретировать и они менее информативны, а третьи чаще применяют в препаративных целях, чем для получения количественных данных, относящихся к структуре макромолекул. Мы начнем с метода вискозиметрии.

ИЗМЕРЕНИЕ ВЯЗКОСТИ

Вискозиметрические измерения привлекательны простотой их выполнения. В ряде случаев для того, чтобы точно измерить вязкость раствора, достаточно иметь капиллярный вискозиметр, недорогого стеклянный прибор (рис. 12.1, А). Мы определили вязкость η (гл. 10) через силу, которая необходима для поддержания в жидкости градиента dv/dx , направленного по нормали к этой силе:

$$F = \eta A(dv/dx) \quad (12.1)$$

где A — площадь поверхности, образованной линиями тока. В капиллярном вискозиметре роль такой силы выполняет гидростатическое давление. В капилляре радиуса a эта сила равна произведению давления на площадь поперечного сечения: $F = P\pi a^2$.

Элементарная сила, действующая на слой жидкости, заключенный между двумя коаксиальными цилиндрическими поверхностями с радиусами x и $x + dx$ (рис. 12.1, Б), выражается просто:

$$dF = 2\pi x P dx \quad (12.2)$$

поскольку площадь поперечного сечения составляет $2\pi x dx$. Если скорость течения жидкости через капилляр установилась, то эта сила должна уравниваться силой трения при любом значении x . Площадь боковой поверхности цилиндрического слоя составляет $2\pi x l$. Силу, действующую со стороны жидкости на одну из поверхностей этого слоя, получаем по формуле (12.1) со знаком минус, так как она направлена против внешней силы:

$$F = -\eta l 2\pi x (dv/dx) \quad (12.3)$$

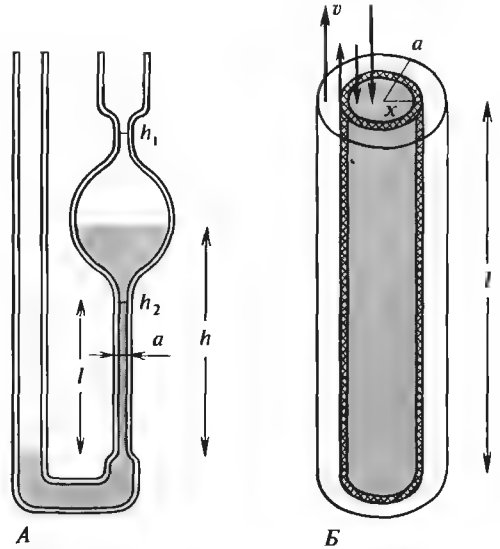
Результирующая сила, действующая на этот слой вследствие движения жидкости, равна разности сил, приложенных к каждой из сторон данного слоя:

$$dF = -\eta l 2\pi \left(\frac{d[x(dv/dx)]}{dx} \right) dx \quad (12.4)$$

Теперь мы можем приравнять друг другу выражения (12.2) и (12.4) для дифференциала силы, сократив при этом общий множитель $2\pi dx$:

$$Px = -\eta l \left(\frac{d[x(dv/dx)]}{dx} \right) \quad (12.5)$$

РИС. 12.1. Измерение вязкости с помощью капиллярного вискозиметра. А. Стандартный вискозиметр Оствальда. Собственно капилляр длиной l расположен ниже отметки h_2 . Уровень раствора поднимают до отметки h_1 и измеряют время, за которое он опустится до отметки h_2 . Б. Увеличенное изображение капилляра. Выделен цилиндрический элемент объема жидкости, который фигурирует при выводе закона Пуазейля. В верхней части рисунка дана схема распределения скоростей в потоке в системе координат, привязанной к элементу объема жидкости на расстоянии x от оси капилляра.



Это уравнение легко проинтегрировать; в результате получим

$$Px^2/2 + C_1 = -\eta l x (dv/dx) \quad (12.6)$$

где C_1 — постоянная интегрирования. Поделив обе части на x и вновь интегрируя, получим

$$Px^2/4 + C_1 \ln x + C_2 = -\eta l v \quad (12.7)$$

Мы можем найти постоянные C_1 и C_2 , используя граничные условия. В центре капилляра (при $x = 0$) скорость течения должна оставаться конечной величиной, отсюда $C_1 = 0$. Если мы примем условие липкости в качестве граничного условия (см. гл. 10), то по периметру капилляра скорость должна обращаться в нуль; отсюда $C_2 = -Pa^2/4$. Получившаяся в результате формула хорошо известна. Распределение скорости течения жидкости внутри капилляра будет параболическим:

$$v = (P/4\eta l)(a^2 - x^2) \quad (12.8)$$

Эта формула дает картину распределения скоростей в потоке. Легче, однако, измерить объемную скорость истечения, которую получим, умножая скорость движения цилиндрического слоя на площадь его сечения $2\pi x dx$ и интегрируя вдоль радиуса от оси до стенок капилляра:

$$dV/dt = \int_0^a 2\pi x v dx = (\pi P/2\eta l) \int_0^a (a^2 - x^2)x dx = \pi P a^4/8\eta l \quad (12.9)$$

Формула (12.9) представляет собой закон Пуазейля. Обычно в опытах с капиллярным вискозиметром определяют время, за которое уровень жидкости с плотностью ρ понизится с отметки h_1 до отметки h_2 (рис. 12.1). Это происходит только за счет гидростатического давления, величина которого равна $\rho g h$, где h — высота столба жидкости между уровнями в двух коленах вискозиметра, а g — ускорение силы тяжести. Величина этого давления уменьшается по мере понижения уровня жидкости в колене с капилляром. Время, за которое вытечет весь объем V жидкости, получаем интегрированием уравнения (12.9):

$$t = (8\eta l/\pi g \rho a^4) \int_{h_1}^{h_2} dV/h \quad (12.10)$$

Интеграл здесь — величина постоянная для каждого конкретного прибора. Обычно ее определяют путем калибровки по жидкости с известной плотностью: чаще всего для этой цели берут тот растворитель, который входит в состав раствора с исследуемыми макромолекулами.

ВЛИЯНИЕ СКОРОСТИ СДВИГА НА ВЕЛИЧИНУ ИЗМЕРЯЕМОЙ ВЯЗКОСТИ

Процедура измерения вязкости в капилляре довольно проста и легко выполнима, необходимо лишь следить за чистотой капилляра. Измерениям вязкости присущи только два недостатка. Во-первых, требуется значительное количество раствора, и, во-вторых (что более существенно), сдвиговые усилия в жидкости, развивающиеся внутри стандартного капиллярного вискозиметра при поддержании градиента скорости в потоке, весьма значительны. Напряжение сдвига S определяют как силу, действующую на единицу площади в жидкости и возникающую в результате течения последней. Скорость сдвига — это градиент скорости, направленный по нормали к этой силе (рис. 10.8). Так что, преобразуя уравнение (12.1), мы приходим к соотношению, связывающему напряжение сдвига и скорость сдвига:

$$S = F/A = \eta(dv/dx) \quad (12.11)$$

Отметим, что это равенство представляет реальную картину слишком упрощенно, потому что даже в случае плоскопараллельных пластин (рис. 10.8, Б) S и dv/dt все же остаются векторами. В более общем случае и скорость сдвига, и напряжение сдвига представляют собой тензоры. Здесь, однако, нам будет достаточно упрощенного представления.

Из-за сдвиговых напряжений происходит ориентация жестких палочкообразных молекул, таких как низкомолекулярная ДНК. В случае более гибких макромолекул, которым свойственна клубкообразная конформация, сдвиговые напряжения могут вызвать деформацию клубка. Поэтому наличие сдвиговых напряжений может сказаться на величине измеряемой в препарате вязкости. От величины напряжения сдвига в очень большой степени зависит наблюдаемая в опыте вязкость растворов ДНК. На рис. 12.2 приведены некоторые типичные примеры такой зависимости. При очень больших напряжениях сдвига может даже произойти разрыв макромолекулы. Важно поэтому проводить измерения при очень малых значениях скорости сдвига, а лучше всего экстраполировать результаты к нулевой скорости сдвига.

Среднее напряжение сдвига в капиллярном вискозиметре можно вычислить, исходя из уравнения (12.6). Мы уже нашли, что $C_1 = 0$. Таким образом, уравнение (12.6) приводится к виду уравнения (12.11), и мы получаем формулу для напряжения сдвига в цилиндрическом слое жидкости радиуса x :

$$S_x = \eta(dv/dx) = -Px/2l \quad (12.12)$$

Среднее напряжение сдвига получаем, интегрируя это выражение по всем слоям, умножив его предварительно на площадь поперечного сечения слоя и поделив на суммарную площадь:

$$S = \int_0^a 2\pi x l dx S_x / \int_0^a 2\pi x l dx = -Pa/3l \quad (12.13)$$

Давление зависит от высоты столба жидкости между уровнями в двух коленах вискозиметра. Поэтому на практике можно варьировать величину напряжения сдвига, регулируя высоту столба жидкости в вискозиметре. Следует иметь в виду, что давление не остается постоянным во время каждого отдельного измерения в капиллярном вискозиметре, так как высота столба жидкости постоянно убывает. Поэтому на самом деле для того, чтобы

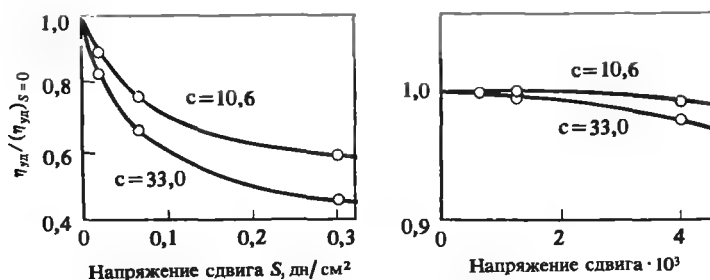


РИС. 12.2. Зависимость удельной вязкости от напряжения сдвига. Показано, как меняется удельная вязкость раствора ДНК бактериофага Т2 (относительно соответствующего значения при нулевой величине напряжения сдвига) при двух разных концентрациях ДНК (мкг/см^3) в некотором диапазоне изменения напряжения сдвига. Результаты измерений, полученные при очень малых скоростях сдвига, показаны на рисунке справа. Обратите внимание на то, что при очень малых значениях скорости сдвига вязкость практически перестает от нее зависеть. Из формы кривых с очевидностью следует, что попытки получить $[\eta]$ из графика зависимости $\eta_{\text{уд}}$ от концентрации окажутся успешными лишь при очень малых значениях скорости сдвига. Для рассматриваемых здесь препаратов ДНК найденная экспериментально величина характеристической вязкости оказалась равной $31\,600\text{ см}^3/\text{г}$. [Crothers, Zimm, J.Mol. Biol., 12, 525 (1965).]

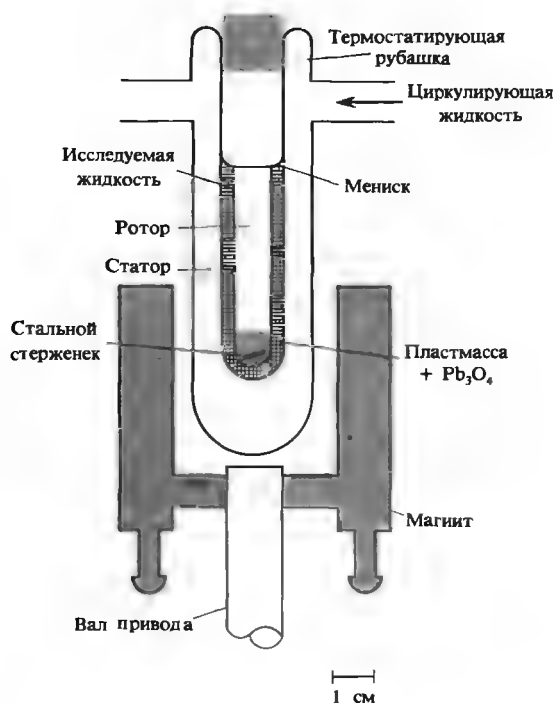


РИС. 12.3. Ротационный вискозиметр Зимма—Крозерса для работы при малых значениях напряжения сдвига (вид в разрезе). [Zimm, Crothers, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48, 905 (1962).]

вычислить истинно среднее за время опыта напряжение сдвига, нужно проинтегрировать по времени уравнение (12.13) и поделить результат на время опыта, выражаемое формулой (12.10).

В обыкновенном капиллярном вискозиметре в опытах с водой S составляет ~ 10 дин/см². Гораздо меньшие значения напряжения сдвига можно получить в ротационном вискозиметре; на рис. 12.3 изображен один из вариантов такого прибора. Вращающееся магнитное поле создает постоянный вращающий момент, приложенный к внутреннему цилиндру (ротору), который свободно плавает в исследуемом растворе. В результате ротор вращается с постоянной угловой скоростью ω . Эта скорость меньше скорости вращения магнитного поля. Можно показать, что отношение вязкостей любых двух растворов выражается просто как $\eta_1/\eta_2 = \omega_2/\omega_1$. Скорость сдвига можно варьировать, либо изменяя размеры ротора, либо (что более удобно) изменяя напряженность прикладываемого магнитного поля. При работе с водными растворами в вискозиметре Зимма—Крозерса (изображенном на рис. 12.3) можно проводить измерения при значениях напряжения сдвига, не превышающих 0,0006 дин/см².

ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛ РАСТВОРЕННОГО ВЕЩЕСТВА НА ВЯЗКОСТЬ РАСТВОРА

Измерить вязкость довольно легко, однако очень большие трудности возникают при попытке рассчитать, исходя из фундаментальных представлений, как сказывается на вязкости раствора присутствие в нем взвешенных частиц. Физическая задача состоит в том, чтобы учесть, как частица искажает линии тока в растворе, где установился градиент скорости. При двумерной картине потока (рис. 10.8, А) эта задача достаточно сложна. А в реальном трехмерном случае дело обстоит еще хуже. Чтобы рассчитать, как искажаются линии тока, мы должны были бы учесть, что скорость сдвига и напряжение сдвига являются тензорами. Тогда нетрудно было бы подсчитать, сколько энергии расходуется в единицу времени на поддержание данной скорости сдвига. В простейшем случае, для изображенного на рис. 10.8, Б условного прибора с плоскопараллельными пластинами, соответствующий расход энергии¹⁾ равен

$$Fv_n = \eta (dv/dz)^2 Ah \quad (12.14)$$

где $v_n = h(dv/dz)$ — скорость движущейся нижней пластины относительно неподвижной верхней пластины. Уравнение (12.14) позволяет определить η как скорость диссипации энергии в единице объема ($Ah = 1$) при единичной скорости сдвига ($dv/dz = 1$). Читателя, которого не пугает тензорное исчисление, мы отсылаем к работе Ямакавы (Yamakawa, 1971), где он сможет ознакомиться с расчетом вязкости суспензии, содержащей взвешенные сферические частицы. Здесь мы лишь кратко изложим результаты таких расчетов.

В общем случае вязкость суспензии должна быть нелинейной функцией концентрации частиц, поскольку при высоких концентрациях искажение, вносимое одной частицей в картину распределения скоростей в жидкости, может влиять на скорость сдвига в области соседней частицы. Таким образом, вообще говоря, можно ожидать, что отношение вязкости раствора к вязкости чистого растворителя представимо в виде степенного ряда:

$$\eta = \eta_0(1 + k_1 c_2 + k_2 c_2^2 + \dots) \quad (12.15)$$

где c_2 — концентрация растворенного вещества в г/см³. Отношение η/η_0 называют относительной вязкостью, $\eta_{\text{отн}}$. Удельную вязкость определяют как

$$\eta_{\text{уд}} = \eta_{\text{отн}} - 1 = k_1 c_2 + k_2 c_2^2 + \dots \quad (12.16)$$

¹⁾ Выражение, стоящее в левой части уравнения (12.14), имеет размерность: сила · длину/время = энергия/время.

Из этого определения следует, что в $\eta_{\text{уд}}$ содержится вся информация о характере влияния растворенного вещества на вязкость раствора. Коэффициент k_1 в таком вириальном разложении можно приписать вкладу, который вносят отдельные молекулы растворенного вещества, k_2 отражает попарное взаимодействие при контакте двух молекул и т.д. Наибольший интерес представляет величина k_1 , которая несет информацию о свойствах индивидуальных макромолекул. Ее называют характеристической вязкостью и обозначают символом $[\eta]$; из опытных данных ее можно получить следующим образом:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} (\eta_{\text{уд}}/c_2) = \lim_{c_2 \rightarrow 0} (k_1 + k_2 c_2 + \dots) = k_1$$

Следует помнить о том, что единицы измерения $[\eta]$, $\eta_{\text{уд}}$ и η различны: η измеряют в пуазах, $[\eta]$ — в $\text{см}^3/\text{г}$, а $\eta_{\text{уд}}$ — безразмерная величина.

Именно $[\eta]$ и можно рассчитать, рассматривая добавочную диссипацию энергии, вызванную присутствием взвешенной молекулы сферической формы массой $m = M/N_0$ в поле градиентов скоростей в жидкости. Некоторое представление о свойствах $[\eta]$ можно получить из анализа ее размерности. Скорее всего, в выражение для $[\eta]$ должны входить такие переменные, как радиус r и масса m молекулы. Мы знаем, что фрикционные свойства сферической частицы зависят от ее радиуса, а энергия, которую приобретает падающий шарик, зависит от его массы. Поэтому можно ожидать, что

$$[\eta] \propto m^a r^b \text{ в единицах измерения } \text{г}^a \cdot \text{см}^b \quad (12.18)$$

Поскольку $[\eta]$ измеряется в $\text{см}^3/\text{г}$, положим $a = -1$ и $b = 3$. Тогда

$$[\eta] \propto r^3/m \propto V_{\text{гидр}} N_0/M \quad (12.19)$$

где $V_{\text{гидр}}$ — объем гидратированной молекулы растворенного вещества, а M/N_0 — ее масса в безводной форме.

Впервые полное выражение для $[\eta]$ получил Эйнштейн. Он представил результат в виде $\eta_{\text{уд}} = 2,5 \phi_2$, где ϕ_2 — объемная доля, занимаемая сферическими молекулами растворенного вещества. Удивительно здесь то, что $\eta_{\text{уд}}$ (а потому и $[\eta]$) не зависит от размера сферических частиц. Так как $V_{\text{гидр}}$ — объем гидратированной молекулы, $V_{\text{гидр}} N_0/M$ представляет собой объем, занимаемый единицей массы (1 г) растворенного вещества. Таким образом, $\phi_2 = V_{\text{гидр}} N_0 c_2 / M$, поскольку c_2 — число граммов растворенного вещества в 1 см^3 раствора. Формулу Эйнштейна можно переписать в виде

$$\eta_{\text{уд}} = 2,5 (V_{\text{гидр}} N_0 / M) c_2 \text{ или } [\eta] = 2,5 (V_{\text{гидр}} N_0 / M) \quad (12.20)$$

Сравнивая выражения (12.19) и (12.20), можно видеть, что анализ размерностей приводит к правильной функциональной зависимости, но, конечно, таким путем нельзя найти величину безразмерного коэффициента, который здесь равен 2,5. Мы уже вывели выражение для $V_{\text{гидр}}$ (гл. 10). Подставляя его из формулы (10.11), получим для характеристической вязкости

$$[\eta] = 2,5 (\bar{V}_2 + \delta_1 \bar{V}_1) \quad (12.21)$$

где $\bar{V}_2$ и $\bar{V}_1$ — парциальные удельные объемы соответственно растворенного вещества и растворителя (воды), а δ_1 — коэффициент гидратации (степень гидратации) в граммах на грамм. Из последнего уравнения видно, что характеристическая вязкость не зависит от молекулярной массы, и этот вывод подтверждается экспериментальными данными, которые представлены в табл. 12.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ ВИСКОЗИМЕТРИЧЕСКИХ ИЗМЕРЕНИЙ¹⁾

Образец	Молекулярная масса	$[\eta]$, см ³ /г	V_2' , см ³ /г	Максимально возможное значение δ_1 , г/г	Максимально возможное значение a/b для вытянутого эллипсоида	Параметр β Шераги — Манделькерна ($\cdot 10^6$)
<i>Глобулярные частицы</i>						
Рибонуклеаза А (бычья)	13 683	3,3	0,728	0,59	3,9	2,01
Лизоцим (цыпленка)	14 211	2,7	0,688	0,39	3,2	—
Сывороточный альбумин (бычий)	66 296	3,7	0,734	0,75	4,4	2,04
Гемоглобин	68 000	3,6	0,749	0,69	4,1	—
Вирус кукурузной карликовости томата	10 700 000	3,4	0,74	0,62	4,0	—
<i>Стержневидные частицы</i>						
Тропомиозин	93 000	52	0,74	20	29	—
Фибриноген	330 000	27	0,71	10	20	2,15
Поли- γ -бензил-L-глутамат (α -спираль)	340 000	720	—	—	—	—
Миозин	493 000	217	0,728	86	68	—
Вирус табачной мозаики	40 000 000	37	—	—	—	2,61
<i>Клубкообразные частицы</i>						
ДНК	6 000 000	5 000	—	—	—	—
Сывороточный альбумин (бычий — в мочеvine)	66 296	22	—	—	—	~2,05
Сывороточный альбумин (бычий — в гуанидине)	66 296	52	—	—	—	—
Поли- γ -бензил-L-глутамат (клубок)	340 000	184	—	—	—	—

¹⁾ Данные большей частью заимствованы у Танфорта (Tanford C., Physical Chemistry of Macromolecules, New York, Wiley, 1961).

ЗАВИСИМОСТЬ ВЯЗКОСТИ ОТ ФОРМЫ МОЛЕКУЛ

Какой смысл имеет измерение вязкости, если последняя не зависит от молекулярной массы? Оказывается, величина $[\eta]$ в очень большой степени зависит от формы и конформации молекул. Для клубкообразных молекул она зависит от размеров клубка и от того, насколько свободно растворитель может протекать сквозь клубок, не участвуя при этом в гидродинамических взаимодействиях (гл. 19). Для молекул, моделью которых служат жесткие эллипсоиды вращения, формула (12.21) приобретает вид

$$[\eta] = v(\bar{V}_2 + \delta_1 \bar{V}_1) = v V_{\text{гидр}} N_0 M \quad (12.22)$$

Коэффициент v называют коэффициентом Симхи¹⁾, им полностью представлена зависимость $[\eta]$ от формы молекулы²⁾; всегда $v \geq 2,5$. В табл. 10.2 приведены значения v для вытянутых и сплюснутых эллипсоидов. На рис. 12.4 представлен график зависимости v от величины отношения осей a/b в области не слишком больших значений отношения осей. Для отношения осей больше 10 коэффициент Симхи можно рассчитать по асимптотическим формулам:

$$v = \frac{(a/b)^2}{5[\ln(2a/b) - 1/2]} + \frac{(a/b)^2}{15[\ln(2a/b) - 3/2]} + \frac{14}{15} \quad (12.23a)$$

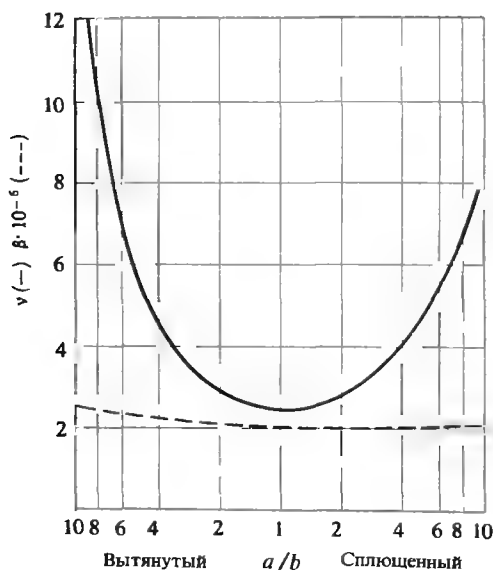


РИС. 12.4. Зависимость коэффициента v Симхи (сплошная линия) и параметра β Шераги—Манделькерна (штриховая линия) от логарифма отношения осей в области не слишком больших значений отношения осей. Сравните их с графиком на рис. 10.10; это позволит получить представление об относительной чувствительности различных гидродинамических методов к изменению формы молекулы.

¹⁾ В отечественной литературе его называют также инкрементом вязкости или фактором формы.
— Прим. ред.

²⁾ Концентрации в вискозиметрических опытах иногда измеряют в граммах на 100 см³ (децилитр, дл) вместо г/см³. В этих единицах формула (12.22) приобретает вид $[\eta] = (v/100)(V_2 + \delta_1 V_1)$, так что получаемые значения $[\eta]$ уменьшаются в 100 раз. При работе с приводимыми в литературе данными по вязкости не забывайте проверить единицы измерения.

для вытянутых эллипсоидов и

$$\nu = (16/15)(a/b)/\operatorname{arctg}(a/b) \quad (12.236)$$

для сплюснутых эллипсоидов.

Моделью длинных стержней (таких, например, как фрагменты ДНК не слишком больших размеров, сохраняющие в силу этого значительную жесткость) могут служить вытянутые эллипсоиды вращения. Их характеристическая вязкость, как правило, удовлетворяет зависимости вида $[\eta] = kM^\alpha$ (где k и α — константы) или ненамного сложнее. Для гомологического ряда стержней одинакового диаметра молекулярная масса прямо пропорциональна длине. Выражая длины через отношение осей вытянутого эллипсоида, мы найдем коэффициент α , вычислив $d(\ln [\eta])/d[\ln(a/b)]$. Преобразовав формулу (12.23) (пренебрегая при этом величинами $-1/2$, $-3/2$ и $14/15$), получим

$$\nu = (20/75)(a/b)^2/\ln(2a/b) \quad (12.24)$$

$$\alpha = d(\ln \nu)/d[\ln(a/b)] = 2 - 1/\ln(2a/b) \quad (12.25)$$

Для отношения осей порядка 10^3 $\alpha \approx 1,8$.

В более реалистической модели стержень представляют в виде прямолинейной цепочки из n сферических мономерных единиц диаметра d , длина которой $L = nd$. Кирквуд рассчитал характеристическую вязкость таких цепочек с помощью операций, аналогичных тем, что применялись при расчете коэффициента трения по уравнениям (10.24) — (10.33). Конечное выражение имеет вид

$$\begin{aligned} [\eta] &= 2\pi N_0 L^2 d / 45 M_0 \ln(L/d) = (N_0 V_{\text{гидр}} / M_0) [2\pi L^2 d / (4/3)\pi(d/2)^3] / 45 \ln(L/d) = \\ &= (V_{\text{гидр}} N_0 / M_0) (20/75) (L/d)^2 / \ln(L/d) \end{aligned} \quad (12.26)$$

где $V_{\text{гидр}}$ — объем мономера, а M_0 — молекулярная масса мономера в безводной форме. Сравнивая эту формулу с формулой (12.22), видим, что при больших длинах группа множителей, эквивалентная коэффициенту Симхи ν , совпадает с выражением для ν в формуле (12.24). Достаточно заменить L/d на отношение осей a/b и заметить, что в формуле (12.24) $\ln(2a/b) = \ln 2 + \ln(a/b) \approx \ln(a/b)$ (при больших значениях a/b).

Интересно сопоставить зависимости коэффициентов Симхи и Перрена для вытянутых и сплюснутых эллипсоидов от величины отношения осей. На основании данных, представленных в табл. 10.2, можно заключить, что у коэффициентов Симхи зависимость от формы выражена в гораздо большей степени. Удлиненную или сплюснутую форму намного легче обнаружить методом вискозиметрии, чем посредством седиментационных или диффузионных измерений. Более того, с помощью вискозиметрии мы можем оценить параметры формы, даже не зная величины молекулярной массы. Вместе с тем мы не можем определить молекулярную массу на основе одних лишь вискозиметрических измерений, если только молекула не является клубком. Когда требуется различить две формы: вытянутую и сплюснутую, вязкость является более чувствительным критерием, чем коэффициент трения. На практике, если на основе опытных данных для коэффициента Симхи получена величина 15 и более, то это фактически является гарантией того, что вы работаете с вытянутыми или стержнеобразными макромолекулами. Соответствующая сплюснутая форма была бы почти неправдоподобно тонкой.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ С ПОМОЩЬЮ ИЗМЕРЕНИЙ ВЯЗКОСТИ

В общем случае и фактор формы $F^{(1)}$ Перрена, и коэффициент ν Симхи монотонно возрастают с увеличением отношения осей. Этот факт наводит на мысль о том, нельзя ли скомбинировать $[\eta]$ с результатами седиментационных или диффузионных измерений так, чтобы исключить в основном влияние формы молекулы и получить, таким образом, хороший способ определения молекулярной массы.

Формулу (10.68) для коэффициента трения эллипсоида можно переписать, введя туда объем гидратированной формы:

$$f = 6\pi\eta(3/4\pi)^{1/3} V_{\text{гидр}}^{1/3} F \quad (12.27a)$$

Подставив это выражение в формулу для коэффициента седиментации: $s = M(1 - \bar{V}_2\rho)/N_0 f$, получим

$$6\pi(3/4\pi)^{1/3} F = M(1 - \bar{V}_2\rho)/N_0 s V_{\text{гидр}}^{1/3} \eta \quad (12.27b)$$

В формулу (12.22) (для характеристической вязкости) также входит объем гидратированной молекулы. Перенеся в одну сторону равенства все константы и члены, характеризующие форму молекулы, и извлекая из обеих частей равенства кубический корень, получим

$$N_0^{1/3} v^{1/3} = [\eta]^{1/3} M^{1/3} / V_{\text{гидр}}^{1/3} \quad (12.28)$$

Поделив равенство (12.28) на равенство (12.27b), мы исключим объем гидратированной формы:

$$\beta \equiv (N_0 / 162\pi^2)^{1/3} v^{1/3} F = N_0 s [\eta]^{1/3} \eta M^{-2/3} (1 - \bar{V}_2\rho) \quad (12.29)$$

Уравнение (12.29) называют уравнением Шераги—Манделькерн. Оно оказывается полезным ввиду свойств параметра β' . При работе с этим уравнением принято измерять характеристические вязкости в дл/г. Поэтому приводимые в таблицах значения параметра Шераги—Манделькерн обычно дают в виде $\beta = 100^{1/3}\beta'$. В табл. 10.2 приведены значения параметра Шераги—Манделькерн в зависимости от величины отношения осей, а на рис. 12.4 представлен график его зависимости от логарифма отношения осей. Можно вывести уравнение, подобное уравнению (12.29), скомбинировав соотношения, полученные для вязкости и диффузии, однако пользуются таким уравнением довольно редко, так как надежных данных по диффузии получено мало.

Мы видим, что β гораздо меньше зависит от величины отношения осей, нежели коэффициент Симхи или фактор формы Перрена. Действительно, в случае сплющенного эллипсоида β возрастает от значения $2,12 \cdot 10^6$ всего лишь до $2,15 \cdot 10^6$ при изменении величины отношения осей с 1 до 200. Поэтому, если по результатам вискозиметрических и седиментационных измерений $\beta > 2,15 \cdot 10^6$ для препарата, содержащего глобулярные частицы с известной молекулярной массой, то такие частицы должны иметь вытянутую форму (см. табл. 10.2 или рис. 12.4). Но поскольку сам параметр β нечувствителен к изменению формы, для того чтобы рассчитать величину отношения осей такого вытянутого эллипсоида, лучше всего воспользоваться отдельно данными по вязкости или седиментации. Уравнением Шераги—Манделькерн пользуются в основном для расчета молекулярных масс. Белок с величиной отношения осей больше 10 встречается крайне редко. В этих редких случаях обычно имеется какое-либо указание на столь высокое значение отно-

¹⁾ В отечественной литературе его называют иногда коэффициентом относительного трения. — Прим. ред.

шения, например, очень большая характеристическая вязкость. Поэтому, исключая подобные случаи, β можно считать равным примерно $2,20 \cdot 10^6$. Истинное значение β для неизвестного белка вряд ли отличается от этой величины более чем на 5%. Поскольку $M \propto \beta^{-3/2}$, величина молекулярной массы, полученная с помощью уравнения Шераги — Манделькерна, не должна отличаться от истинного значения более чем на 10%. В табл. 11.2 на ряде примеров проводится сопоставление полученных таким образом значений молекулярных масс с оценками, полученными другими способами.

НЕКОТОРЫЕ СЛУЧАИ ПРИМЕНЕНИЯ ВИСКОЗИМЕТРИЧЕСКИХ ИЗМЕРЕНИЙ

Нечувствительность параметра β к изменению формы особенно полно проявляется в одном отношении: в уравнение Шераги — Манделькерна вообще не входит степень гидратации. Поэтому, комбинируя седиментационные и вискозиметрические данные, мы можем в принципе определить величину отношения осей, на которую никак не влияет неопределенность в значении δ_1 . Зная же параметры формы молекулы, можно определить δ_1 , используя повторно либо данные по седиментации, либо по вязкости. К сожалению, уравнение Шераги — Манделькерна не позволяет оценить параметры формы с достаточной точностью; то же относится и к получаемой с его помощью степени гидратации. Эти утверждения можно проверить, сформулировав задачу следующим образом: допустим, что мы знаем величину отношения осей для некоторого белка по данным рентгеновской кристаллографии; каковы будут тогда степени гидратации, вычисленные на базе тех или иных гидродинамических измерений, и насколько хорошо они согласуются между собой? В табл. 12.2 приведено несколько примеров таких проверок на самосогласованность. Результаты, полученные на основе вискозиметрических, диффузионных и седиментационных измерений, согласуются неплохо. Однако при малых значениях отношения осей зависимость всех коэффициентов — β , ν и F — от формы настолько слаба, что можно ожидать значительных расхождений в значениях отношения осей, рассчитанных по каждому из этих трех типов данных при одном и том же значении степени гидратации.

Полезно сделать несколько замечаний общего характера относительно вязкости. Характеристическая вязкость $[\eta]$ — параметр, весьма чувствительный к конформационным изменениям. У глобулярных макромолекул (типа белковых) после денатурации молекулярная масса остается прежней, а $[\eta]$ часто возрастает во много раз; при этом $s_{20,w}$ уменьшается хотя и заметным образом, но не так сильно. Если длинный жесткий стержень (например, ДНК) становится более гибким или превращается в клубок (при денатурации ДНК), то происходит значительное уменьшение $[\eta]$, а $s_{20,w}$ возрастает. Напротив, если форма остается прежней, но уменьшается молекулярная масса (как в случае диссоциации олигомерных структур на субединицы), то уменьшается $s_{20,w}$, а $[\eta]$ либо вовсе не изменяется, либо изменяется незначительно в ту или другую сторону. (В табл. 12.1 приведено несколько примеров такого рода изменения вязкости.)

Вязкость давно используют для того, чтобы отличать клубкообразные молекулы от стержневидных. Ранее мы показали, что в случае стержня $[\eta] \propto M^{1,8}$. В гл. 19 мы покажем, что для клубка $[\eta] \propto M^{0,5} \div M^{1,0}$. Рис. 12.5 дает поразительный пример того, насколько метод измерения вязкости чувствителен к конформации молекул. Видно, что на зависимость $[\eta]$ поли- γ -бензил-*L*-глутамата от молекулярной массы, полученную на ряде фракций с разной молекулярной массой полимера, существенно влияет тип растворителя. В CHCl_3 $[\eta] \propto M^{1,7}$, что указывает на стержневидную конформацию и заставляет предполагать наличие α -спирали. В CHCl_2COOH $[\eta] \propto M^{0,83}$, что заставляет предполагать конформацию несколько набухшего клубка. Это явление имеет простое истолкование. Сильный, образующий водородные связи растворитель типа CHCl_2COOH эффективно конку-

Таблица 12.2

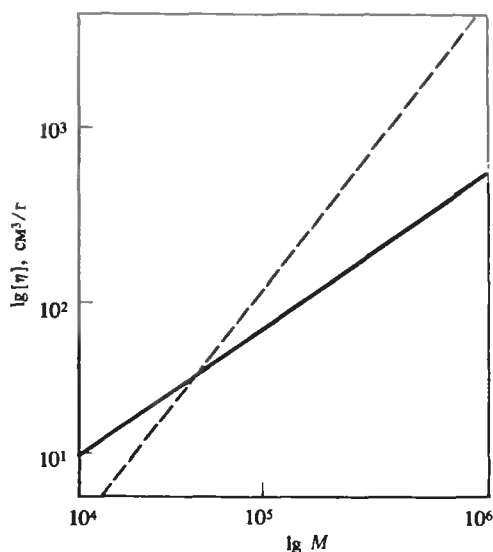
СТЕПЕНИ ГИДРАТАЦИИ БИОПОЛИМЕРОВ, РАССЧИТАННЫЕ С УЧЕТОМ ПАРАМЕТРОВ ФОРМЫ МОЛЕКУЛ, ОПРЕДЕЛЕННЫХ ПОСРЕДСТВОМ ДИФРАКЦИИ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ ИЛИ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ¹⁾

Образец	Отношение осей (из независимого источника) ²⁾	Степень гидратации (δ_1 , г/г) по данным		
		вязкости	диффузии	седиментации
Вирус кустистой карликовости				
томата	1,0	0,65	0,71	0,71
Карбоксипептидаза	1,25	—	0,30	0,69
Цитохром <i>c</i>	1,48	—	0,18	0,24
Гемоглобин	1,3	0,62	0,52	0,75
Лизоцим	1,5	0,34	0,52	0,52
Миоглобин	1,76	0,44	0,50	0,42
Вирус табачной мозаики	18	0,32	0,1 — 0,7	0,26

¹⁾ Данные Кунтца и Козмана (Kuntz I. D., Jr., Kauzmann W. In: *Advances in Protein Chemistry*, vol. 28, ed. C. B. Anfinsen, J. T. Edsall and F. M. Richards, New York, Academic Press, 1974, p. 239).

²⁾ Отношения осей соответствуют вытянутым эллипсоидам вращения, за исключением цитохрома *c*, моделью которого является сплюснутый эллипсоид.

РИС. 12.5. Зависимость характеристической вязкости от молекулярной массы. Здесь в двойных логарифмических координатах изображен график зависимости характеристической вязкости поли- γ -бензил-L-глутамата от молекулярной массы. Сплошная линия относится к измерениям в дихлоруксусной кислоте, штриховая — к измерениям в смеси хлороформ — формамид (99,5 : 0,5) или в диметилформамиде. [Doty et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 947 (1956).]



рирует с донорами и акцепторами водородных связей пептидной цепи, что приводит к денатурации α -спирали.

УПРУГОВЯЗКАЯ РЕЛАКСАЦИЯ

Тенденция коротких молекул ДНК ориентироваться (или червеобразных клубков, в которые свернуты длинные молекулы ДНК, деформироваться) в градиенте скорости является помехой во многих исследованиях. Однако Клотц и Зимм обратили это досадное обстоятельство в свою пользу и получили изящный и ценный метод исследования наиболее длинных молекул ДНК. Рис. 12.6 дает в общих чертах представление о том, как они измеряли скорость упруговязкой релаксации. Если к ротору в ротационном вискозиметре, где находится раствор ДНК, приложить внешний вращающий момент, то конфигурация цепей ДНК в среднем изменится, перейдя от конформации статистического клубка к более вытянутой. Энергия, которая затрачивается на этот переход, обеспечивается вращающим моментом, создаваемым внешними силами, и передается через градиент скорости в жидкости. В конечном счете устанавливается стационарный режим. Внутренняя энергия молекул ДНК при этом увеличивается вследствие изменения конфигурации их цепей. Если убрать внешний момент, то при отсутствии ДНК вращение замедлилось бы и вскоре прекратилось. Однако при наличии ДНК ротор не остановится до тех пор, пока не произойдет релаксация молекул ДНК обратно в состояние статистического клубка. Происходит быстрая смена направления вращения ротора, после чего он очень медленно «доползает» до конечного положения. Те силы, которые возникли под действием исходного вращающего момента, вызвавшего вытягивание клубка, создают теперь на роторе некоторый момент все то время, пока происходит релаксация цепей. Оказывается, этот эффект может длиться поразительно долго.

Как показали впервые Зимм и Раус, кинетика перехода статистического клубка, образованного цепями однородного полимера, из возмущенного состояния в конечное невозмущенное равновесное состояние с гауссовым распределением плотности сегментов цепи представляет собой сложный процесс. Он описывается суммой экспоненциальных членов e^{-t/τ_k} , каждый из которых характеризуется своим временем релаксации

$$\tau_k = (M\eta_0[\eta]/RT)(1/\lambda_k) \quad (12.30)$$

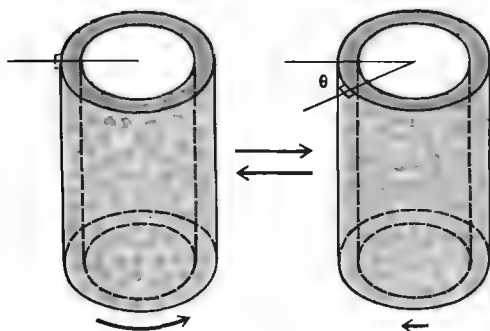


РИС. 12.6. Схематическое изображение опыта по релаксационной вискозиметрии. Реальный прибор, в котором проводили опыт, напоминает аппарат, изображенный на рис. 12.3. Наружный цилиндр медленно поворачивают на некоторый угол θ относительно исходного положения. Затем внешний момент убирают, и цилиндр оказывается свободно плавающим в растворе. С этого момента он начинает поворачиваться в обратную сторону, при этом измеряют θ как функцию времени до тех пор, пока θ не достигнет конечного значения, $\theta(\infty)$.

где η_0 — вязкость растворителя. Константы λ_k являются функциями собственных значений, получаемых из уравнений движения при рассмотрении динамики релаксации макромолекул. Здесь важно то, что величина λ_k^{-1} быстро уменьшается с увеличением k . Для клубков, образованных линейными цепными молекулами, $\lambda_1^{-1} = 0,451$, а множители λ_1^{-1} , λ_2^{-1} и λ_3^{-1} образуют убывающую последовательность в пропорции 1 : 0,31 : 0,16. Для клубков, образованных кольцевыми молекулами, все λ_i^{-1} равны примерно половине величины соответствующей константы линейной формы.

Можно показать, что в опытах по измерению упруговязкой релаксации в предельном случае разбавленных макромолекулярных растворов дрейф угла отклонения ротора $\theta(t)$ к его значению $\theta(\infty)$, соответствующему бесконечно большому времени, следует закону

$$\theta(t) - \theta(\infty) = \left(\omega_p \eta_{уд} \left/ \sum_{k=1}^n \tau_k \right. \right) \left(\sum_{k=1}^n \tau_k^2 e^{-t/\tau_k} \right) \quad (12.31)$$

где ω_p — начальная угловая скорость ротора (при отсчете времени с момента выключения вращающего момента). Формула (12.31) удобна тем, что каждая экспонента входит в сумму с весом τ_k^2 , при этом члены ряда быстро убывают с увеличением k . Поэтому при больших временах дрейф ротора с хорошей точностью должен описываться единственной экспонентой, и время релаксации τ_1 получаем из равенства

$$d\{\ln[\theta(t) - \theta(\infty)]\}/dt = -1/\tau_1 \quad (12.32)$$

Так как число λ_1 известно из предварительного механического рассмотрения, то, определив τ_1 , η_0 и $[\eta]$, с помощью уравнения (12.30) получаем величину молекулярной массы. Такой подход не устраняет всех трудностей; очень непросто, например, измерить характеристическую вязкость высокомолекулярной ДНК. Другой подход использует эмпирически полученные соотношения, связывающие $[\eta]$ с молекулярной массой. В случае ДНК довольно хорошее согласие с экспериментом дает формула

$$M = k([\eta] + b)^{3/2} \quad (12.33)$$

где $k = 19,8$ для линейной формы ДНК, а $b = 500 \text{ см}^3/\text{г}$. Пренебрегая константой b в случае больших ДНК (характеристическая вязкость которых может достигать $10^4 \text{ см}^3/\text{г}$ и более) и комбинируя уравнения (12.30) и (12.33), получим (при 298 К)

$$M = 1,45 \cdot 10^8 \tau_1^{3/5} \quad (12.34)$$

Из формулы (12.34) вытекает несколько любопытных следствий. Молекулярная масса пропорциональна степени 3/5 измеренной величины, что весьма выгодно, поскольку ошибки измерений не слишком сильно влияют на получаемый в итоге результат. Так как наблюдаемая в опыте величина τ_1 пропорциональна $M^{5/3}$, весовой коэффициент в формуле (12.31) пропорционален $M^{10/3}$. Допустим, что препарат гетерогенен: почти всегда при выделении очень больших молекул ДНК в препарате оказывается некоторое количество фрагментированной ДНК. Но процесс релаксации, описываемый уравнением (12.31), определяется главным образом самой высокомолекулярной фракцией; влияние остальных молекул крайне незначительно.

$$\theta(t) - \theta(\infty) \propto \sum_i f_i M_i^{10/3} \exp[-t(2,2 \cdot 10^8/M_i)^{5/3}] \quad (12.35)$$

где f_i — относительное число молекул с молекулярной массой M_i . Таким образом, даже половинки молекул не смогут внести заметный вклад в процесс релаксации на заключительном этапе, а небольшие молекулы будут вовсе «невидимы». Любые агрегаты, однако, могут сильно осложнить дело.

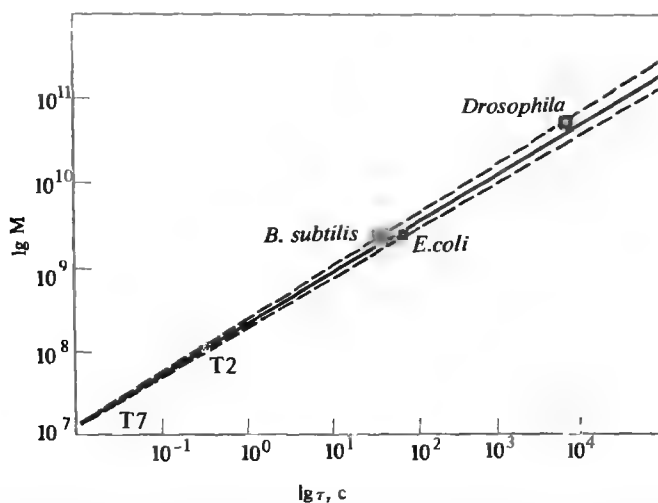


РИС. 12.7. Характеристическое время упруговязкой релаксации в зависимости от молекулярной массы. Этот построенный в двойных логарифмических координатах график показывает, как связана молекулярная масса ДНК, выделенной из разных организмов, с наибольшим временем релаксаций τ , наблюдаемым при упруговязкой релаксации. Величины молекулярных масс ДНК из *E. coli*, *B. subtilis* и бактериофагов T7 и T2 были известны из других источников. Эти значения были использованы при построении приведенной здесь экспериментальной зависимости, с помощью которой смогли оценить молекулярную массу целой ДНК, содержащейся в хромосоме дрозофилы. [Kavenoff et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **38**, 1 (1974).]

На рис. 12.7 представлены типичные результаты измерений упруговязкой релаксации ДНК. Обратите внимание на чрезвычайно большие времена релаксации молекул, массы которых составляют $\sim 10^9$ и более а.е.м. Отличное согласие с экспериментом, полученное для ДНК с известными молекулярными массами, показывает, что формула (12.34) правильна. Данный метод с успехом использовали для определения молекулярных масс ДНК вплоть до значений, близких к 10^{11} . Гигантские молекулы ДНК с такой молекулярной массой (примером которых могут служить молекулы, выделенные из целых развернутых хромосом бактерий или эукариот) настолько непрочны, что их невозможно даже переместить из одного сосуда в другой. Для того чтобы их исследовать, необходимо клетки, содержащие такую ДНК, подвергнуть лизису непосредственно в ротационном вискозиметре и освободить ДНК *in situ* от связанных с ней белков посредством обработки детергентами и ферментативного расщепления. Для смешивания этих реагентов с клеточным лизатом можно использовать только конвекцию, поскольку любое перемешивание недопустимо. Естественно, приходится ограничиваться очень малыми скоростями ротора, чтобы уменьшить вероятность разрыва молекулы в градиенте скорости. Угол, на который повернется ротор за промежуток времени между включением вращающего момента и началом процесса релаксации, должен быть минимальным: это всегда менее одного оборота.

12.2. Методы, использующие вращательное движение молекул

Как было показано в гл. 10, для описания вращательного движения несферических тел недостаточно просто коэффициента трения. Поэтому трение приходится описывать с по-

мощью тензора $\mathbf{f}$. Изучая вращательную диффузию, мы получаем распределение $W(\theta, \phi, t)$ осей молекул по ориентациям точно так же, как при изучении поступательной диффузии получаем распределение молекул в пространстве; $W(\theta, \phi, t)$ здесь — доля молекул, угол ориентации которых лежит в пределах от θ до $\theta + d\theta$ и от ϕ до $\phi + d\phi$ в момент времени t .

Соотношение, эквивалентное второму закону Фика, можно записать как

$$\partial W(\theta, \phi, t) / \partial t = - \underline{\mathbf{L}} \cdot \underline{\mathbf{D}}_{\text{вр}} \cdot \underline{\mathbf{L}} W(\theta, \phi, t) \quad (12.36)$$

где $\underline{\mathbf{L}}$ — оператор момента количества движения, а $\underline{\mathbf{D}}_{\text{вр}}$ — тензор вращательной диффузии. Для многих предельных случаев, когда доминирует какая-нибудь одна составляющая $\underline{\mathbf{D}}_{\text{вр}}$, уравнение (12.36) упрощается и принимает вид

$$\partial W(\theta, \phi, t) / \partial t = D_{\text{вр}} \nabla^2 W(\theta, \phi, t) \quad (12.37)$$

Поскольку измерения вращательной диффузии проводят в отсутствие каких бы то ни было градиентов концентраций, при решении уравнения (12.37) нет нужды слишком беспокоиться о том, какова зависимость $D_{\text{вр}}$ от концентрации. По аналогии с уравнением Эйнштейна—Сазерленда $D_{\text{вр}} = kT/f_{\text{вр}}$. Необходимо решить, однако, который из трех возможных вращательных коэффициентов трения — f_a , f_b или $f_{\text{гидр}}$ — следует здесь использовать (см. гл. 10). Выбор, оказывается, зависит от того, какой метод применяют для регистрации $W(\theta, \phi, t)$.

Чтобы наблюдать вращательную диффузию, необходимо выполнение двух предварительных условий. Во-первых, должно быть нарушено нормально существующее в водном растворе равновесное изотропное распределение осей молекул по ориентациям. И во-вторых, нужно найти какое-либо свойство системы, которое могло бы служить мерой преимущественной ориентации. В большинстве методов для получения преимущественной ориентации к системе прикладывается некая сила. Если имеется такая сила, то в уравнении (12.37) появится дополнительный член, описывающий момент, приложенный к молекулам, который индуцирует эта сила. В этом случае оно является аналогом уравнения Ламма, в котором учитывались противоположно направленные эффекты седиментации и диффузии. Соответствующая форма уравнения (12.37) должна учитывать противоположно направленные эффекты, вызываемые действием момента и вращательной диффузии. При седиментации или иной форме прямолинейного переноса молекул действие достаточно большой силы приводит к тому, что все растворенное вещество собирается у одной из стенок того сосуда, в котором проводят опыт: при этом мы не получим интересующего нас равновесного распределения. Напротив, под действием большого вращающего момента возможно лишь установление некоторой максимальной ориентации, тогда как поступательное движение отсутствует.

Решение уравнения (12.37) при наличии внешней силы представляет собой очень трудную задачу, и его редко удавалось получить в аналитической форме. Принято работать в двух предельных случаях. В первом случае определяют $W(\theta, \phi, t)$, т.е. ориентационное распределение, установившееся под действием какой-то конкретной силы, в состоянии механического равновесия (после того, как прекратятся все переходные, зависящие от времени, процессы) — такой подход напоминает равновесное центрифугирование. Во втором случае перестают прикладывать силу и наблюдают обратный процесс перехода распределения $W(\theta, \phi, t)$ в распределение, отвечающее изотропному раствору, — этот переходный процесс подчиняется уравнению (12.37), решение которого можно получить в аналитическом виде. В ультрацентрифугировании этому случаю отвечала бы такая постановка опыта, при которой вещество некоторое время подвергали бы седиментации, затем резко снижали скорость ротора до пренебрежимо малой величины и наблюдали за тем, как происходит уширение границы в результате диффузии.

ИЗМЕРЕНИЕ ПРЕИМУЩЕСТВЕННОЙ ОРИЕНТАЦИИ В ПОТОКЕ С ПОМОЩЬЮ ЛИНЕЙНОГО ДИХРОИЗМА

Названия различных методов исследования вращательных движений составлены из названий той силы, под действием которой происходит ориентация, и той поддающейся регистрации величины, с помощью которой следят за ориентацией. В качестве примера рассмотрим линейный дихроизм в потоке. При наличии градиента скорости в жидкости молекулы будут ориентироваться. Предположим, что этот градиент мы получим, поместив раствор между двумя коаксиальными цилиндрами, один из которых неподвижен, а другой вращается с постоянной угловой скоростью в приборе, подобном изображенному на рис. 12.3. Можно показать, что при наличии равновесия уравнение (12.37) приобретает вид

$$D_{\text{вр}} \nabla^2 W(\theta, \phi, \alpha) = \nabla \cdot W(\theta, \phi, \alpha) \omega(\theta, \phi) \quad (12.38)$$

где ω — угловая скорость, приобретаемая частицей в градиенте скорости.

Это уравнение можно решить, но будет полезней получить некоторое представление о физической стороне вопроса, рассмотрев двумерную задачу о движении стержня в поле градиента скорости (рис. 12.8). Допустим, что диаметры цилиндров достаточно велики для того, чтобы можно было пренебречь кривизной; это означает, что, по существу, градиент возникает из-за движения двух параллельных пластин, и потому распределение скоростей в жидкости линейное. Пусть θ — угол между продольной осью стержня и направлением ламинарного течения, вызванного сдвиговыми напряжениями. Вращающий момент минимален при $\theta = 0^\circ$, и стержень стремится сохранить эту ориентацию в течение длительного времени. Но эта ориентация не является устойчивой, поскольку толщина

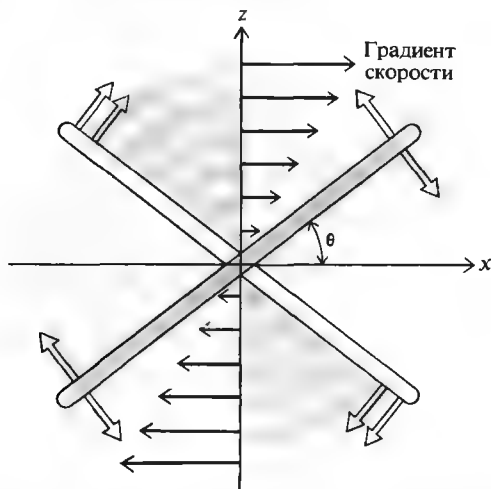


РИС. 12.8. Силы, действующие на жесткий стержень в градиенте скорости. Как показано на рисунке, сдвигающие силы создают вращающий момент, вызывающий вращение стержня по часовой стрелке. Эти силы стремятся сохранить ориентацию стержня при $\theta = 0^\circ$ (при этом сдвиговые усилия минимальны) в течение более длительного времени, нежели при $\theta = 90^\circ$ (в этом случае сдвиговые усилия максимальны). Вращательное броуновское движение стремится разрушить всякую преимущественную ориентацию, т.е. создает некий эффективный момент, который стремится повернуть каждую молекулу к $\theta = 90^\circ$. Здесь имеются в виду лишь нормальные к оси молекулы составляющие всех сил, поскольку другие составляющие могут вызвать лишь параллельный перенос молекулы, но неспособны изменить ее ориентацию.

стержня отлична от нуля, т.е. стержень все еще находится под действием некоторых не равных нулю сдвиговых напряжений, и, стало быть, сохраняется некоторый ненулевой вращающий момент. При $\theta = 90^\circ$ момент максимален, и стержень быстро проскакивает это угловое положение. Таким образом, при наличии градиента скорости мы получим анизотропное распределение. Вращающие силы, обусловленные броуновским движением, стремятся нарушить такую ориентацию (рис. 12.8). При малых градиентах скорости наиболее вероятная ориентация стержня наблюдается при значениях θ , близких к $\theta = 45^\circ$, где силы, обусловленные броуновским движением, и сдвиговые усилия равны по величине и противоположны по направлению. При больших градиентах скорости все стержни стремятся сохранить ориентацию при значениях θ , близких к $\theta = 0^\circ$.

Ориентация в потоке вытянутого эллипсоида вращения влияет лишь на угловое положение его большой оси. Если силу, поддерживающую градиент скорости, внезапно «выключить» в некоторый момент времени, условно принимаемый за начало отсчета ($t = 0$), то положение большой оси (a) может измениться лишь за счет поворота вокруг малой оси (b). Средняя величина преимущественной ориентации $\langle W(\theta, \phi, t) \rangle$ убывает во времени согласно зависимости

$$\langle W(\theta, \phi, t) \rangle = \langle W(\theta, \phi, 0) \rangle e^{-t/\tau_c} \quad (12.39)$$

где $\tau_a = f_b/2kT$. Как видно из уравнения (10.23), f_b — вращательный коэффициент трения эллипсоида при повороте вокруг малой оси.

Значительно осложняет дело то обстоятельство, что $\langle W(\theta, \phi, t) \rangle$ нельзя получить посредством прямых измерений. Для того чтобы обнаружить анизотропную ориентацию молекул, приходится использовать какое-либо спектроскопическое или электрическое свойство, зависящее от средней величины преимущественной ориентации. Например, можно регистрировать линейный дихроизм или линейное двойное лучепреломление системы. (Линейный дихроизм, возникающий вследствие неодинакового поглощения молекулой поляризованного света при разной ориентации электрического вектора относительно фиксированных направлений в молекуле, мы рассматривали в гл. 7.) В случае эллипсоидальных макромолекул для описания анизотропного поглощения света часто бывает достаточно двух коэффициентов экстинкции: $\epsilon_{\parallel}$, характеризующего поглощение плоскополяризованного света, электрический вектор которого параллелен большой оси вытянутого эллипсоида, и $\epsilon_{\perp}$, характеризующего поглощение света, поляризованного перпендикулярно той же оси (рис. 12.9). Эффект линейного дихроизма является отражением неодинаковости $\epsilon_{\parallel}$ и $\epsilon_{\perp}$. Удобной мерой этой неодинаковости служит разность $\Delta\epsilon_L = \epsilon_{\parallel} - \epsilon_{\perp}$.

Линейный дихроизм частично ориентированного макроскопического образца определяют, анализируя поглощение или ослабление света, поляризованного параллельно определенному направлению в лабораторной системе координат. Регистрируемое поглощение является результатом усреднения вкладов в поглощение поляризованного света, вносимых молекулами, распределенными по разным ориентациям в пространстве. Обозначим через α угол между продольной осью какой-либо молекулы и макроскопическим направлением поляризации (рис. 12.9). Количество света, поглощаемого каждой молекулой, зависит от данного угла и от двух вышеупомянутых коэффициентов экстинкции, $\epsilon_{\parallel}$ и $\epsilon_{\perp}$. Как было показано в гл. 7, интенсивность поглощения света, поляризованного под углом α относительно направления максимального поглощения, пропорциональна $\cos^2 \alpha$. Поэтому в случае, который иллюстрирует рис. 12.9, где изображена молекула, лежащая в плоскости страницы и ориентированная под углом α к световому вектору, очевидно, что коэффициент экстинкции

$$\epsilon_a = \epsilon_{\parallel} \cos^2 \alpha + \epsilon_{\perp} \cos^2(90^\circ - \alpha) = \epsilon_{\parallel} \cos^2 \alpha + \epsilon_{\perp} \sin^2 \alpha \quad (12.40)$$

Если преимущественная ориентация или поляризация отсутствует, то изотропный коэф-



РИС. 12.9. Система координат для описания анизотропии поглощения поляризованного света эллипсоидальной молекулой. Здесь α — угол между большой осью вытянутого эллипсоида вращения и направлением поляризации света.

Коэффициент экстинкции выражается просто: $\epsilon = (\epsilon_{||} + 2\epsilon_{\perp})/3$ (где множитель 2 появляется потому, что у эллипсоида две поперечные оси и только одна продольная, а вероятность для каждой из них иметь произвольную наперед заданную ориентацию одна и та же). Экспериментально, однако, оказалось удобнее измерять разность между ϵ_{α} и ϵ . Для раствора измеряемая величина равна разности $(\epsilon_{\alpha} - \epsilon)$, усредненной по ориентациям всех молекул:

$$\begin{aligned} \langle \epsilon_{\alpha} - \epsilon \rangle &= \langle \epsilon_{||} \cos^2 \alpha + \epsilon_{\perp} \sin^2 \alpha - \epsilon_{||}/3 - 2\epsilon_{\perp}/3 \rangle = \\ &= \langle (\epsilon_{||} - \epsilon_{\perp}) \cos^2 \alpha - \epsilon_{||}/3 + \epsilon_{\perp}/3 \rangle = \Delta\epsilon_L \langle \cos^2 \alpha \rangle - 1/3 \end{aligned} \quad (12.41)$$

Здесь мы воспользовались тождеством $\sin^2 \alpha + \cos^2 \alpha = 1$. Таким образом, найдя из опыта $\langle \epsilon_{\alpha} - \epsilon \rangle$, мы сможем оценить среднюю степень ориентации, $\langle \cos^2 \alpha \rangle$, при условии, что $\Delta\epsilon_L$ можно вычислить или определить независимым образом. Последнее можно осуществить двумя способами: либо приложить силу, достаточно большую для того, чтобы полностью ориентировать образец, либо попытаться проэкстраполировать $\langle \epsilon_{\alpha} - \epsilon \rangle$ к значению, соответствующему бесконечно большой силе. Найдя $\langle \cos^2 \alpha \rangle$, можно далее перейти от этой величины к $\langle W(\theta, \phi, t) \rangle$, которая используется в уравнении (12.39).

ИЗМЕРЕНИЕ ПРЕИМУЩЕСТВЕННОЙ ОРИЕНТАЦИИ В ПОТОКЕ С ПОМОЩЬЮ ЛИНЕЙНОГО ДВОЙНОГО ЛУЧЕПРЕЛОМЛЕНИЯ

Линейное двойное лучепреломление представляет собой эффект, в точности аналогичный линейному дихроизму. Он возникает в том случае, когда различаются значения показателя преломления молекулы при ориентации светового вектора соответственно по ее двум главным геометрическим осям: $\Delta n = n_{||} - n_{\perp}$. Наблюдаемое в растворе с ориентированными молекулами двойное лучепреломление представляет собой сумму двух эффектов: эффекта собственной анизотропии молекул и эффекта анизотропии формы. Первый эффект является следствием оптической анизотропии самих молекул. Его можно связать с $\Delta\epsilon_L$ через преобразование Кронига—Крамерса (гл. 8). Но даже и в том случае, когда для самих молекул $\Delta n = 0$, раствор с ориентированными несферическими молекулами является двоякопреломляющим, если показатели преломления растворенного вещества и растворителя различны; этот эффект представляет собой двойное лучепреломление, обусловленное анизотропией формы. Как и в случае линейного дихроизма, измеряемая в опыте величина двойного лучепреломления зависит от того, как расположены молекулярные оси относительно задаваемых в эксперименте направлений.

Все эти соображения приводят нас к выводу о том, что мы фактически всегда измеряем некую функцию ориентации $f(\theta, \phi, t)$, а не $W(\theta, \phi, t)$. В эту функцию входит $W(\theta, \phi, t)$ с весом, пропорциональным степени влияния ориентации на изучаемый оптический параметр. Оказалось, что для двойного лучепреломления

$$f(\theta, \phi, t) = f(\theta, \phi, 0)e^{-3t/\tau_a} \quad (12.42)$$

Исходя из уравнений, приведенных в гл. 10, для случая сильно вытянутого эллипсоида можно показать, что

$$\tau_a = 8\pi\eta a^3/3kT[2 \ln(2a/b) - 1] \quad (12.43)$$

Таким образом, время релаксации возрастает примерно как куб длины продольной оси. Столь высокая чувствительность побуждает исследователей не оставлять попыток разрешить ряд трудных оптических и гидродинамических задач, которые ставит двойное лучепреломление или дихроизм в потоке.

В основе другого способа определения τ_a лежит измерение степени ориентации молекул в поле постоянных напряжений сдвига. Ее можно найти, изучая двойное лучепреломление

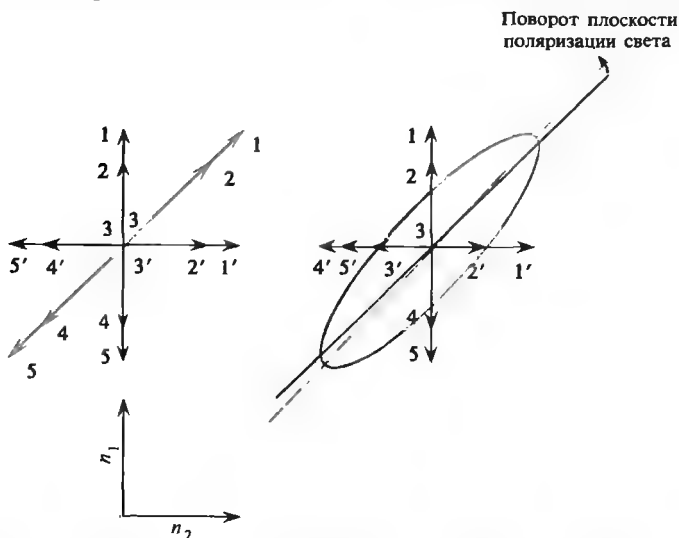


РИС. 12.10. Эффект прохождения плоскополяризованного света через двоякопреломляющую среду. *Вверху слева:* плоскополяризованный свет (коричневая линия) падает на образец, характеризуемый двумя отличными друг от друга значениями показателя преломления ($n_2 > n_1$), которые соответствуют двум различным ориентациям плоскости поляризации, изображенным внизу слева. Падающий на образец свет можно разложить на два плоскополяризованных пучка, в каждом из которых плоскость поляризации параллельна одной из оптических осей (направление, описываемое только одним значением показателя преломления). Стрелками и цифрами отмечены положения электрического вектора световой волны (светового вектора) через равные промежутки времени. *Справа:* свет, прошедший через двоякопреломляющую среду, поляризован по эллипсу (коричневая линия), поскольку составляющая светового вектора по оси n_2 отстает по фазе от составляющей по оси n_1 . Для тонких образцов (или таких, у которых эффект двойного лучепреломления выражен слабо) этот эллипс настолько вытянут, что сохраняется сходство с плоскополяризованным светом. Можно сказать, таким образом, что двоякопреломляющая среда вызвала поворот плоскости поляризации. Сравните ориентацию большой оси эллипса (коричневая штриховая линия) с исходной ориентацией плоскости поляризации света. (Можно видеть, что в том случае, когда плоскость поляризации падающего света параллельна любой из оптических осей, вращения не происходит, поскольку свет «видит» лишь один показатель преломления.)

образца. Если раствор обнаруживает слабый эффект двойного лучепреломления, то наблюдается феномен кажущегося поворота плоскости поляризации света, кроме тех случаев, когда плоскость поляризации параллельна или перпендикулярна одной из оптических осей (рис. 12.10). Оптическими осями (в молекулярной системе координат) называют направления, параллельные или перпендикулярные тем ориентациям светового вектора, при которых показатель преломления эквивалентного эллипсоида вращения имеет максимальное или минимальное значение. Обычно оптические оси совпадают с геометрическими осями. Поэтому угол χ между какой-либо из макроскопических оптических осей, характеризующих анизотропию всего раствора, и направлением потока служит мерой степени ориентации.

Угол χ можно определить, поместив исследуемый раствор, в котором создано поле напряжений сдвига, между двумя скрещенными поляризаторами (рис. 12.11). Если раствор изотропен, то при этом свет через систему вовсе не проходит. Однако при наличии эффекта двойного лучепреломления свет проходит всюду, кроме четырех зон, где направление макроскопической оптической оси совпадает с направлением вектора поляризации. Простой геометрический расчет показывает, что угол между зоной с нулевым пропусканием и осью одного из поляризаторов равен χ^1 . При малых градиентах скорости

$$\chi = (\pi/4) - (\tau_w/6)(dv/dx) + \dots \quad (12.44)$$

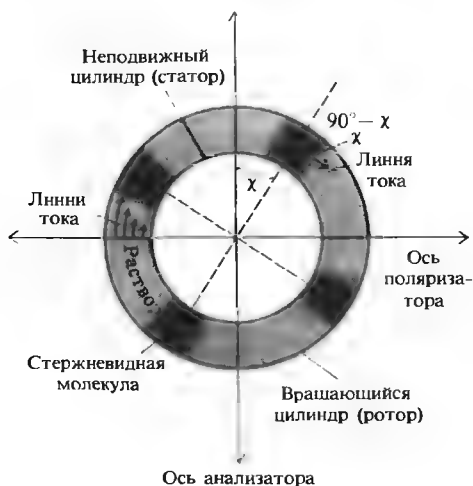


РИС. 12.11. Схематическое изображение опыта, в котором используется эффект двойного лучепреломления для измерения преимущественной ориентации в потоке. Молекулы в исследуемом растворе частично ориентированы в поле градиента скорости, создаваемого двумя коаксиальными цилиндрами, один из которых вращается, а другой неподвижен. Раствор помещен между двумя взаимно перпендикулярными поляризаторами (собственно поляризатором и анализатором). Стержнеобразные молекулы стремятся ориентироваться вдоль потока, как это показано на рис. 12.8. Будем считать, что оптические оси такой молекулы параллельны или перпендикулярны ее продольной оси. Поэтому там, где стержни ориентированы в среднем параллельно или перпендикулярно оси поляризатора, никакого вращения плоскости поляризации не происходит, и поляризованный свет, таким образом, через анализатор совсем не проходит. Измеряя угол χ , мы тем самым непосредственно измеряем угол между продольной осью стержня и направлением течения растворителя.

¹⁾ В том случае, когда оптические оси молекулы совпадают с ее геометрическими осями, угол χ равен углу θ на рис. 12.8.

где χ дан в радианах, а члены с $(dv/dx)^2$ и более высокими степенями градиента скорости опущены. Таким образом, измеряя зависимость χ от величины градиента скорости, мы получим τ_a . Можно видеть, что в предельном случае малых градиентов $\chi \rightarrow 45^\circ$; к такому же выводу мы пришли ранее на основе простых механических соображений.

ОРИЕНТАЦИЯ В ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПОЛЯХ

Для ориентирования молекул в растворе вместо потока можно использовать сильное электрическое поле (рис. 12.12). Электрическое поле обычно подают в виде прямоугольных импульсов. Импульс должен иметь малую длительность, чтобы нагрев раствора и массовый перенос молекул растворенного вещества вследствие электрофореза в этом поле были минимальными. Чтобы не происходило чрезмерного нагревания, раствор должен иметь низкую ионную силу. Измерения двойного лучепреломления и дихроизма в электрическом поле — это просто оптические измерения преимущественной ориентации, появляющейся под действием электрического поля. Как и в случае ориентации в потоке, анализ движений молекул при наличии ориентирующей силы представляет собой сложную задачу. Поэтому принято измерять степень ориентации в установившемся режиме или скорость исчезновения ориентации после отключения электрического поля.

Ориентация молекул под действием электрического поля легко поддается описанию в случае слабого поля. Суммарный заряд молекулы может вызвать лишь ее поступательное движение как целого. Главный член в выражении для энергии взаимодействия, благодаря которой молекулы приобретают преимущественную ориентацию, имеет вид

$$E_\Phi = -\mu \cdot \mathbf{E} \quad (12.45)$$

где μ — постоянный дипольный момент основного состояния. При более сильных полях в этом выражении появляются члены вида $\mathbf{E} \cdot \alpha \cdot \mathbf{E}$, где α — поляризуемость молекулы; эти члены мы здесь опускаем. Из статистической механики известно, что относительная вероятность (при равновесии) состояния (в данном случае ориентации) с энергией E_Φ равна $\exp(-E_\Phi/kT)$. Отсюда нормализованное распределение $W(\theta)$ в электрическом поле имеет вид

$$\begin{aligned} W(\theta) &= e^{\mu E_z \cos \theta / kT} \left/ \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^\pi e^{\mu E_z \cos \theta / kT} \sin \theta d\theta \right. = \\ &= \exp(\mu E_z \cos \theta / kT) / 4\pi kT \operatorname{sh}(\mu E_z / kT) \end{aligned} \quad (12.46)$$

где E_z — проекция $\mathbf{E}$ на ось z . При этом рассматривается случай, когда поле возникает между двумя параллельными пластинами, перпендикулярными оси z , θ — угол, который составляет дипольный момент с направлением поля (рис. 12.13), а $\operatorname{sh} x \equiv (1/2)(e^x - e^{-x})$.

Выражение для $W(\theta)$ можно применять для оценки различных свойств. Рассмотрим, например, линейный дихроизм в растворе при условии, что экстинкция молекулы характеризуется единственным коэффициентом ϵ , отвечающим случаю, когда световой вектор параллелен вектору постоянного дипольного момента. Можно измерить коэффициент экстинкции в свете, поляризованном параллельно (E_z) или перпендикулярно (E_y) направлению внешнего электрического поля. Разница в экстинкции составляет $(\epsilon_z - \epsilon_y)$ (рис. 12.3). Для какой-либо конкретной молекулы $\epsilon_z = \epsilon \cos^2 \theta$ и $\epsilon_y = \epsilon \sin^2 \theta \cos^2 \phi$; вывод аналогичных выражений мы уже приводили, когда рассматривали дихроизм в потоке. Разницу в значениях экстинкции $(\epsilon_z - \epsilon_y)$ необходимо усреднить по ориентациям всех молекул, ис-

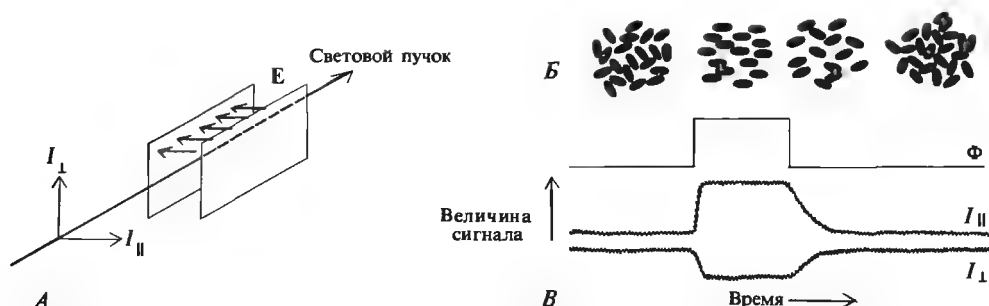


РИС. 12.12. Схема опыта, в котором используется явление дихроизма в электрическом поле. *А.* Геометрия опыта *Б.* Ориентация молекул растворенного вещества в разные моменты времени. *В.* Изменение во времени величины подаваемого на пластины напряжения Φ и интенсивности I прошедшего света, поляризованного параллельно или перпендикулярно направлению внешнего электрического поля E .

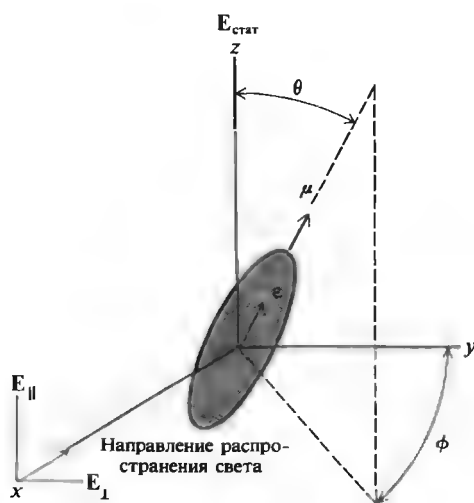


РИС. 12.13. Система координат, которая использовалась при анализе дихроизма в электрическом поле. Свет в падающем пучке распространяется вдоль оси x ; наблюдение ведут вдоль той же оси. Внешнее электростатическое поле E направлено по оси z . В данном частном случае предполагается, что коэффициент экстинкции равен ϵ , если световой вектор параллелен вектору постоянного дипольного момента, и равен нулю, если они взаимно перпендикулярны.

пользуя формулу (12.46)¹⁾:

$$\begin{aligned} \langle \epsilon_z - \epsilon_y \rangle &= \epsilon \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^\pi W(\theta) (\cos^2 \theta - \cos^2 \phi \sin^2 \theta) \sin \theta d\theta = \\ &= (\epsilon/10)(\mu E_z/kT)^2 - (\text{члены с } E_z^4) \end{aligned} \quad (12.47)$$

Очевидно, это в высшей степени искусственная ситуация, и в общем случае необходимо учитывать тот факт, что каждая молекула имеет неодинаковые коэффициенты экстинкции для случаев взаимно параллельной или перпендикулярной ориентации светового вектора и вектора дипольного момента. Однако из формулы (12.47) следует важный вывод

¹⁾ Мы рекомендуем самостоятельно вычислить интеграл в формуле (12.47). Это превосходная возможность проверить, насколько легко вы справляетесь с разложениями в ряд и интегрированием тригонометрических функций.

общего характера, который заключается в том, что при равновесии величина дихроизма в электрическом поле возрастает пропорционально квадрату напряженности этого поля. Аналогичные соотношения можно получить и для случая двойного лучепреломления в электрическом поле.

Можно видеть, что после установления равновесия дихроизм в электрическом поле не несет в явном виде никакой полезной информации о форме молекулы. В этом смысле здесь ситуация подобна той, которая имеет место в случае равновесного центрифугирования, где теряется вся информация такого рода. Однако некоторые сведения о размерах и форме молекулы можно извлечь из величины дипольного момента. В случае, описываемом формулой (12.47), μ можно определить, измерив $\langle \epsilon_z - \epsilon_y \rangle$, при условии, что известен ϵ . В реальном случае вряд ли удастся определить μ таким образом, поскольку поглощение света в молекуле может происходить и по другим направлениям, не параллельным μ , так что формула (12.47) приобретает более сложный вид. При использовании двойного лучепреломления возникают аналогичные трудности. Между случаями ориентации в потоке и ориентации в электрическом поле имеется одно принципиальное различие. Ориентация в потоке происходит под действием гидродинамических сил, так что в стационарном режиме степень ориентации зависит от гидродинамических свойств молекулы. Ориентирующие силы в электрическом поле не имеют прямого отношения к гидродинамике, поэтому при равновесии теряется информация о размерах и форме молекулы.

После выключения электрического поля распределение осей макромолекул по ориентациям из анизотропного вновь становится изотропным. В том довольно распространенном случае, когда ось постоянного диполя совпадает с продольной осью вытянутого эллипсоида, кинетика перехода описывается тем же уравнением (12.42), что и для двойного лучепреломления или дихроизма в потоке. Это объясняется тем, что симметрия анизотропного распределения, установившегося к моменту выключения поля, в этих различных случаях одна и та же. В более общем случае, когда μ не параллелен продольной оси молекулы, может наблюдаться кинетика перехода, описываемая одним или двумя экспоненциальными членами, которые с разным весом учитывают оба вращательных времени релаксации: τ_a и τ_b . Можно также описать кинетику установления преимущественной ориентации для некоторых предельных случаев, следующую за мгновенным включением поля. Для этого нужно решить уравнение (12.37), введя в него предварительно напряженность внешнего электрического поля. Если μ молекулы параллелен ее продольной оси, то кинетика нарастания двойного лучепреломления описывается выражением вида

$$\Delta n / \Delta n_{\infty} = 1 - Ae^{-t/\tau_a} + Be^{-t/3\tau_a} \quad (12.48)$$

где $\Delta n = \langle n_z - n_y \rangle$ (в системе координат рис. 12.13), а Δn_{∞} — конечная равновесная величина двойного лучепреломления. Коэффициенты A и B зависят от величины постоянного дипольного момента (как функции μ^2) и от анизотропии поляризуемости молекулы. Здесь важно то, что скорость установления преимущественной ориентации определяется теми же вращательными временами релаксации, что и скорость ее исчезновения. Правда, ввиду большей сложности полученного выражения оно менее пригодно для анализа данных.

● ДИСПЕРСИЯ ДИЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ

Пользуясь формулой (12.46), можно вычислить еще одну величину — среднюю по всем молекулам растворенного вещества проекцию дипольного момента на ось z :

$$\langle \mu \rangle = \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^{\pi} \sin\theta d\theta \mu \cos\theta W(\theta) = \mu^2 E_z / 3kT - (\text{члены с } E_z^3) \quad (12.49)$$

Средний дипольный момент $\langle \mu \rangle$ вносит свой вклад в величину полной диэлектрической проницаемости раствора. В общем случае величина молекулярной поляризуемости $\alpha = \alpha_i + \alpha_d$, где α_i — поляризуемость, обусловленная деформацией электронной оболочки молекулы под действием поля (и, возможно также, происходящей под действием поля миграцией противоионов), а α_d — поляризуемость, обусловленная индуцированной полем преимущественной ориентацией. Так как наведенный в поле диполь определяется выражением $\mu = g \cdot E$, то из формулы (12.49) следует, что $\alpha_d = \mu^2/3kT$. Здесь мы рассмотрим лишь тот вклад в молекулярную поляризуемость, который вносит α_d .

Можно показать, что поляризуемость чистых жидкостей связана с диэлектрической проницаемостью ϵ соотношением

$$(\epsilon - 1)/(\epsilon + 2) = (4/3)\pi N'\alpha \quad (12.50)$$

где N' — число молекул в 1 см^3 . Для полярных жидкостей получаются более сложные выражения. Существуют хорошо разработанные методы измерения ϵ . Величина диэлектрической проницаемости зависит от частоты электрического поля. С помощью этого явления, называемого дисперсией диэлектрической проницаемости, можно получить некоторую информацию о размерах и форме молекул. В предельном случае низких частот ориентационный член $\mu^2/3kT$ целиком входит в уравнение (12.50), так как при изменении поля молекулы успевают достичь равновесного распределения по ориентациям в каждый момент времени. В предельном высокочастотном случае $\mu^2/3kT$ вообще не может вносить никакого вклада в поляризуемость, поскольку поле изменяется настолько быстро (сравнимо со скоростью движения молекул в вязкой среде), что молекулы, по существу, оказываются «замороженными» в растворителе. При промежуточных частотах вклад от $\mu^2/3kT$ определяется скоростью установления ориентации и скоростью релаксации. В более строгом изложении теория довольно сложна, и здесь мы ее приводить не будем.

ДРУГИЕ СПОСОБЫ ИЗМЕРЕНИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИИ ВРАЩАТЕЛЬНЫХ ДВИЖЕНИЙ

В исследованиях ориентационных движений макромолекул широко применяются еще три метода: поляризации флуоресценции, ЭПР и ЯМР. Эти методы имеют ограниченный диапазон применения; они достаточно сложны и рассматриваются в соответствующих главах этой книги. Для изучения вращательных движений молекул используются также еще несколько новых методов. Из-за вращения молекулы изменяется угловая корреляция между двумя последовательными γ -квантами, испущенными каким-либо ядром (например, I^{r}), за тот небольшой отрезок времени, который проходит между испусканием первого и второго γ -квантов. Если вы сумеете приготовить подходящую иридиевую производную, то сможете применить этот метод даже для изучения движений молекул *in vivo*. Неупругое рассеяние неполяризованного света также несет информацию о молекулярных вращениях — этот метод пока еще не получил достаточно широкого распространения, но он весьма перспективен.

Результаты всех только что описанных измерений вращательного движения можно выразить в общем виде: $\tau_{\text{набл}} = \tau_0 F_{\phi} (V_{\text{гидр}}/V_0)$, где τ_0 — время вращательной релаксации эквивалентной безводной сферы, $V_{\text{гидр}}/V_0$ — отношение объемов гидратированной и безводной сфер, а F_{ϕ} — коэффициент, зависящий от формы молекулы [см. уравнения (10.20) и (10.23), а также рис. 10.10]. В зависимости от рода измерений $\tau_{\text{набл}}$ можно представить одним из времен вращательной релаксации (τ_a или τ_b) либо гармоническим средним от τ_a и τ_b . Для сопоставления с тем, что дают гидродинамические измерения, связанные с поступательным движением (трансляцией) молекул, результаты измерения параметров вращательных движений можно выразить в следующем виде:

$$(\text{вращение}) \quad \tau_{\text{набл}} = K_1 M (\bar{V}_2 + \delta_1 \bar{V}_1) F_{\Phi} \quad (12.51)$$

$$(\text{вязкость}) \quad [\eta] = K_2 (\bar{V}_2 + \delta_1 \bar{V}_1) \nu \quad (12.52)$$

$$(\text{трансляция}) \quad f = K_3 M^{1/3} (\bar{V}_2 + \delta_1 \bar{V}_1)^{1/3} F \quad (12.53)$$

где K_1 , K_2 и K_3 — константы. Ранее мы вывели уравнение Шераги — Манделькерна, скомбинировав выражения для вязкости и седиментации и исключив коэффициент гидратации. Такой подход позволяет однозначно определить параметры формы молекулы и степень гидратации (правда, остается неопределенность в выборе между вытянутой и сплюсченной формами), если известна молекулярная масса. Он обладает, однако, крайне низкой чувствительностью. Данные по вращению можно аналогичным образом увязать с данными по вязкости или трансляции, что позволило бы исключить коэффициент гидратации при совместном решении любой пары вышеприведенных уравнений; при этом опять-таки имеется возможность определить и параметры формы, и коэффициент гидратации. В табл. 12.3 сведены результаты подобных расчетов для нескольких белков. Взаимосогласованность различных методов в этом случае представляется вполне удовлетворительной.

При благоприятных обстоятельствах с помощью методов регистрации вращательных движений можно получить как f_a , так и f_b . Поскольку данные величины для сплюсненного и вытянутого эллипсоидов сильно различаются, при этом можно определить тип эллипсоида, а также отношение его осей. Общий вывод из всех вышеприведенных рассуждений сводится к тому, что эффективность каждого отдельного гидродинамического метода значительно возрастает при проведении параллельных опытов на той же системе с использованием других методов.

Таблица 12.3

ЗАВИСИМЫЕ ДРУГ ОТ ДРУГА ЗНАЧЕНИЯ ОТНОШЕНИЯ ОСЕЙ И КОЭФФИЦИЕНТА ГИДРАТАЦИИ БЕЛКОВ, РАССЧИТАННЫЕ ПРИ КОМБИНИРОВАНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ РАЗЛИЧНЫХ ГИДРОДИНАМИЧЕСКИХ ИЗМЕРЕНИЙ¹⁾

Тип данных, используемых в комбинации	Бычий сывороточный альбумин		β -Лактоглобулин, мономер		Яичный альбумин		Лактатдегидрогеназа	
	a/b	δ_1	a/b	δ_1	a/b	δ_1	a/b	δ_1
ν, F	2,5	0,6	2,5	0,3	4,0	0,2	4,0	0,1
ν, f_a	2,8	0,4	—	—	—	—	—	—
ν, f_b	3,5	0,2	—	—	4,5	0,1	—	—
$\nu, f_{\text{гидр}}$	2,5	0,5	1,5	0,4	4,5	0,1	3,8	0,2
F, f_a	3,5	0,4	—	—	—	—	—	—
F, f_b	2,5	0,6	—	—	4,0	0,2	—	—
$F, f_{\text{гидр}}$	4,0	0,3	2,0	0,4	5,0	0,1	4,0	0,2

¹⁾ Все значения отношения осей приведены для случая вытянутых эллипсоидов вращения; данные Кунтца и Козмана (Kuntz I. D., Jr., Kauzmann W. In: Advances in Protein Chemistry, vol. 28, ed. C. B. Anfinsen, J. T. Edsall and F. M. Richards, New York, Academic Press, 1974, p. 239).

12.3. Хроматография на молекулярных ситах

Трудно представить себе биохимика, который не пользовался бы распределительной гель-хроматографией для фракционирования смеси молекул по их размерам. На рис. 12.14 схематически изображена одна гранула геля из тех, что используются в молекулярных ситах. Удобные в употреблении молекулярные сита с большими размерами пор, такие как сефадекс (сшитые поперечными сшивками полидекстраны) и биогель (сшитый поперечными сшивками полиакриламид), всегда имеются в свободной продаже. Для препаративных целей используются также гранулы из пористого стекла и агарозные гели. Применение подобных материалов дало в руки исследователей действенное средство для разделения смеси молекул на фракции, в которых молекулы имеют приблизительно одинаковые размеры.

СУЩНОСТЬ ЯВЛЕНИЯ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИИ

Качественно нетрудно объяснить, как работают молекулярные сита. Полный объем $V_{\text{п}}$ колонки, содержащей неплотно прилегающие друг к другу гранулы (зерна) геля, складывается из трех компонентов: объема $V_{\text{св}}$ растворителя вне зерен (свободный объем), твердотельного объема $V_{\text{м}}$ полимерной сетки (матрицы) геля и объема $V_{\text{внутр}}$ пустот (пор) внутри зерен, заполненных растворителем:

$$V_{\text{п}} = V_{\text{св}} + V_{\text{м}} + V_{\text{внутр}} \quad (12.54)$$

Если в такую колонку ввести какое-либо вещество, то оно распределится между внешними и внутренними по отношению к зернам областями растворителя (или, как часто говорят, между подвижной и неподвижной фазами. — *Прим. ред.*); результат можно описать с помощью коэффициента распределения σ . Масса $m_{\text{внутр}}$ растворенного вещества, которая окажется внутри геля, составит

$$m_{\text{внутр}} = \sigma V_{\text{внутр}} c \quad (12.55)$$

где c — концентрация растворенного вещества в свободном растворе. Величина σ принимает следующие значения:

- $\sigma = 0$ Молекулы растворенного вещества совсем не могут проникнуть в поры матрицы геля.
- $\sigma < 1$ Обнаружить растворенное вещество в порах менее вероятно, чем в свободном растворе. Наиболее простое объяснение заключается в том, что некоторые поры слишком малы и молекулы растворенного вещества не могут туда проникнуть.
- $\sigma = 1$ Растворенное вещество распределяется равномерно между порами и свободным раствором.
- $\sigma > 1$ Растворенное вещество избирательно поглощается порами на поверхности геля, т.е. происходит своего рода адсорбция.



РИС. 12.14. Схематическое изображение зерна геля, используемого в распределительной гель-хроматографии. Растворитель снаружи зерен (подвижная фаза) занимает объем $V_{\text{св}}$. Растворитель, заполняющий пустоты в зернах (неподвижная фаза), занимает объем $V_{\text{внутр}}$. Матрица геля (показана темными линиями) занимает объем $V_{\text{м}}$, недоступный для растворителя.

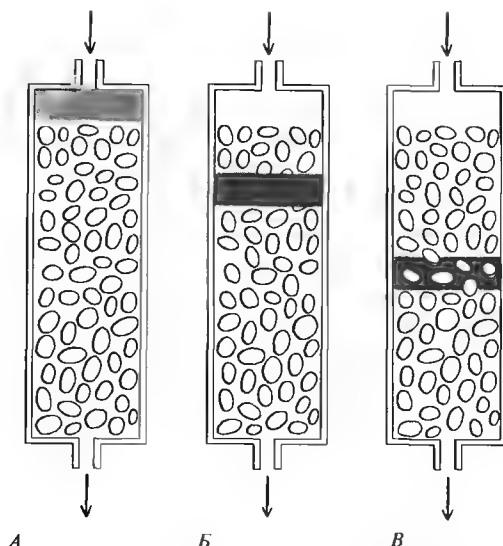


РИС. 12.15. Перенос растворенного вещества при распределительной геле-хроматографии. А. Зона с растворенным веществом до контакта с зернами геля. Б. Та же зона после того, как через колонку прошел некоторый суммарный объем V жидкости; вещество при этом может проникать в большую часть внутренних областей геля. В. Аналогичная зона с веществом, для которого гель совсем непроницаем, после пропускания через колонку того же объема жидкости, что и в предыдущем случае.

Количество растворенного вещества, поглощенного гелем, можно выразить как $m_{\text{внутр}} = c_d V_d$, где V_d — доступный объем (та часть $V_{\text{внутр}}$, которая доступна для какого-то конкретного растворенного вещества), а c_d — концентрация данного вещества в этом объеме. Если мы будем считать раствор термодинамически идеальным, то концентрация растворенного вещества должна быть всюду одна и та же ($c_d = c$), так что мы можем написать для σ

$$\sigma = V_d / V_{\text{внутр}} \quad (12.56)$$

Здесь σ — это доля объема пор в геле, доступная для молекул растворенного вещества. (Согласно альтернативной точке зрения, можно было бы предположить, что в принципе для молекул растворенного вещества доступен весь объем пор в геле. Тогда $V_d = V_{\text{внутр}}$ и $\sigma = c_d / c = c_{\text{внутр}} / c$, т.е. σ равен отношению концентраций растворенного вещества соответственно во внутренних и внешних областях раствора.)

Наиболее распространенный случай применения молекулярных сит — колоночная хроматография. Тонкий слой раствора, содержащего молекулы одного или нескольких типов растворенного вещества, наносят поверх зерен геля, после чего пропускают через колонку растворитель¹⁾ со скоростью, достаточно малой для того, чтобы на любом этапе движе-

¹⁾ Жидкость, которая подается на колонку, называется элюентом; в общем случае это буфер. Раствор, выходящий из колонки, называют элюатом. — *Прим. ред.*

ния зоны все компоненты успевали полностью распределиться между подвижной и неподвижной фазами. Обычно определяют так называемый объем элюирования, т.е. объем растворителя, который нужно прогнать через колонку, прежде чем в элюате появится соответствующее вещество. Если пренебречь диффузией, то можно рассматривать узкую зону с компонентами раствора как изолированную фазу, которая должна вытеснять расположенный ниже растворитель при своем движении вдоль колонки. Вещество, которое совсем не проникает в гель ($\sigma = 0$), вытеснит объем, равный всему свободному объему $V_{\text{св}}$. Но вещество, которое способно проникать в какие-либо поры, в дополнение к свободному объему вытеснит еще доступную для него часть объема внутренних областей в геле: $V_{\text{д}} = \sigma V_{\text{внутр}}$ (рис. 12.15). При постоянной скорости пропускания растворителя (элюции) это вещество будет распространяться вдоль колонки с меньшей, чем в предыдущем случае, скоростью и начнет выходить из колонки при объеме элюирования

$$V_3 = V_{\text{св}} + \sigma V_{\text{внутр}} \quad (12.57)$$

Из формулы (12.57) следует, что σ можно вычислить, измерив объем элюирования, поскольку $V_{\text{внутр}} + V_{\text{св}}$ можно найти, зная массу воды, поглощенной сухой смолой, а $V_{\text{св}}$ можно определить, измерив объем элюирования для частиц, которые заведомо больше любых пор в геле.

АНАЛИЗ ПРОФИЛЕЙ ЭЛЮИРУЕМЫХ ЗОН

Формула (12.57) служит отправным пунктом при описании наблюдаемого в опыте профиля элюируемой зоны с растворенным веществом. Обозначим через ξ долю площади поперечного сечения колонки, которая доступна для молекул растворенного вещества:

$$\xi = (\alpha + \beta\sigma)/A \quad (12.58)$$

где A — площадь всего поперечного сечения, α — часть площади поперечного сечения, принадлежащая подвижной фазе, а β — та часть площади поперечного сечения, которая принадлежит неподвижной фазе. [Заметим, что $(\alpha + \beta) < A$.] Предположим, что элюция происходит при постоянной объемной скорости истечения элюата F_v . Средняя скорость v_x линейного переноса вещества вдоль колонки равна объемной скорости элюции, деленной на доступную для данного вещества площадь:

$$v_x = F_v/\xi A \quad (12.59)$$

v_x измеряется в $(\text{см}^3 \cdot \text{с}^{-1})/\text{см}^2 = \text{см} \cdot \text{с}^{-1}$. Время t , за которое зона с веществом проходит всю колонку длиной l , определяется соотношением $t = l/v_x$. Полный объем, прошедший через колонку за это время (объем элюирования), составит $V_3 = F_v t$. Подставляя сюда выражения для t и v_x , получим

$$V_3 = A \xi l \quad (12.60)$$

Уравнения (12.60) и (12.57) идентичны, в чем нетрудно убедиться, подставив в уравнение (12.60) вместо ξ соответствующее выражение из уравнения (12.58).

Для потока J растворенного вещества в направлении x (вдоль колонки) имеем

$$J = v_x c - L(\partial c/\partial x) = F_v c/\xi A - L(\partial c/\partial x) \quad (12.61)$$

где первый член описывает эффект, обусловленный течением растворителя, а второй учитывает все эффекты, связанные с размыванием зоны с растворенным веществом. Коэффициент L называют коэффициентом продольной дисперсии. Если бы уширение зоны

происходило только за счет диффузии, то L представлял бы собой просто коэффициент диффузии с поправкой на то, что доступна лишь часть площади поперечного сечения. Однако дело обстоит не так просто, поскольку времена фильтрации не настолько велики, чтобы могло установиться полное диффузионное равновесие. Более того, из-за трения скорость течения свободного растворителя вблизи поверхности геля меньше, чем в областях, достаточно удаленных от нее. Закон сохранения массы (обязательный и в этом случае) выражается уравнением (10.49): $\partial c / \partial t = -\partial J / \partial x$. Дифференцируя по x , мы можем преобразовать уравнение (12.61) к следующему виду:

$$(\partial c / \partial t) + (F_v / \xi A)(\partial c / \partial x) = L(\partial^2 c / \partial x^2) \quad (12.62)$$

Уравнение (12.62) — это просто второй закон Фика в движущейся системе координат. Воспользовавшись формулой (12.59) для средней скорости переноса растворенного вещества, мы найдем то расстояние, на которое сместится центр зоны за время t : $x = v_x t = F_v t / \xi A$. Произведя замену переменных, т.е. положив $y = x - F_v t / \xi A$, получим систему отсчета, в которой центр зоны оказывается неподвижным, а уравнение (12.62) переходит в уравнение

$$\partial c / \partial t = L(\partial^2 c / \partial y^2) \quad (12.63)$$

Начальным условиям отвечает такое состояние, при котором зона имеет бесконечно резкую границу и расположена в верхней части колонки ($x = 0$) в момент времени $t = 0$. Таким образом, $y = 0$ при $t = 0$, и исходную зону можно представить дельта-функцией: $c(y, 0) = w_0 \delta(0)$, где w_0 — масса содержащегося в зоне растворенного вещества¹⁾. Мы уже решали это уравнение при точно таких же начальных условиях; воспользовавшись решением, приведенным в Дополнении 10.2, получим

$$c(y, t) = (w_0 / \sqrt{4\pi L t}) \exp(-y^2 / 4Lt) \quad (12.64)$$

Теперь для того, чтобы можно было проводить сравнение с экспериментом, сделаем обратную замену переменных ($y = x - F_v t / \xi A$), заменим t на V / F_v (где V — полный объем жидкости, прошедший через колонку) и исключим x , пользуясь тем обстоятельством, что измерения обычно проводят на выходе колонки, где $x = l = V_s / \xi A$ [уравнение (12.60)]. Далее выразим концентрацию растворенного вещества, элюируемого из колонки, как функцию объемной скорости элюции F_v и объема элюата V :

$$c(F_v, V) = (w_0 / \xi A \sqrt{4\pi L V / F_v}) \exp[-F_v (V_s - V)^2 / 4\xi^2 A^2 L V] \quad (12.65)$$

Формула (12.65) показывает, что при постоянной скорости элюции элюионный профиль $c(F_v, V)$ на выходе колонки для гель-хроматографии не имеет вида простой гауссовой зависимости от объема V элюата.

Часто приходится встречать высказывания, смысл которых заключается в том, что элюируемая зона представляет собой единственный гауссов пик, и поэтому данный материал является гомогенным веществом. Из вышеизложенного ясно, что такое утверждение неверно. В самой колонке, однако, профиль зоны с растворенным веществом в любой фиксированный момент времени t имеет вид простой гауссовой зависимости по y , а следовательно, и по x . Экерс (Ackers, 1975) разработал изящные методические приемы, позволяющие непосредственно путем сканирования регистрировать распределение растворенного вещества в колонках с гелем. С помощью этой методики легко определяется коэффициент L , и, что еще важнее, при этом упрощается количественный анализ смесей растворенных веществ или систем, не достигших равновесия.

¹⁾ c здесь и в формуле (12.64) имеет размерность: масса/длина. — Прим. ред.

СВОЙСТВА МОЛЕКУЛЯРНЫХ СИТ В СВЯЗИ С РАЗМЕРАМИ И КОНФОРМАЦИЕЙ МАКРОМОЛЕКУЛ

Теперь остается связать σ со свойствами макромолекулярных компонентов раствора. Из уравнений, которые мы вывели ранее, можно видеть, что все три величины — σ , ξ и V_3 — равноценны [см. уравнения (12.58) и (12.60)]. Если бы все поры в геле имели одинаковые размеры, то σ должен был бы представлять собой ступенчатую функцию, равную единице для молекул, размеры которых меньше размеров пор, и равную нулю для молекул, размеры которых превышают размеры пор. Если же имеется некоторое распределение пор по размерам, то наблюдается некая плавная зависимость σ от размера молекул. Не следует забывать, что величина коэффициента распределения для макромолекулы определяется именно ее размерами, а не массой. Конечно, для молекул одинаковой формы размеры являются функцией молекулярной массы. Многие исследователи показали, что существует корреляция между σ и молекулярной массой. При хроматографии разных белков на определенном геле

$$\sigma = -A \lg M + B \quad (12.66a)$$

где A и B — константы. Рис. 12.16 иллюстрирует такую корреляцию. Для многих молекул соответствующие точки хорошо ложатся на кривую предсказываемой зависимости, но некоторые явно выпадают из нее.

Более тщательный анализ приводит к зависимости вида

$$\sigma = -A' \lg r_{\text{гидр}} + B' \quad (12.66b)$$



РИС. 12.16. Объем элюирования различных белков на колонке, для набивки которой использовался сефадекс G-200, как функция молекулярной массы белка. По вертикальной оси справа отложена величина отношения объемов элюирования соответственно белка и голубого декстрана (высокомолекулярного полисахарида, который, как полагают, не проникает внутрь геля). [Andrews, *Biochem. J.*, 96, 595 (1965).]

где $r_{\text{гидр}}$ — эффективный радиус гидратированной молекулы. Это та самая величина, которая получалась бы из диффузионных измерений, если бы мы, никак не учитывая форму молекулы, просто формально применили бы закон Стокса: $kT/D = f = 6\pi\eta r_{\text{гидр}}$. Формула (12.666) лучше согласуется с экспериментальными данными, чем формула (12.66а). Поэтому при наличии достаточно надежного способа калибровки, позволяющего определить коэффициенты A' и B' , распределительную гель-хроматографию можно использовать для измерения коэффициента трения макромолекулы. Поскольку посредством гель-хроматографии находят $r_{\text{гидр}}$, в ряде случаев полагают, что этот метод эквивалентен диффузионным измерениям. Результаты, полученные с помощью гель-хроматографии, можно комбинировать с измерениями коэффициента седиментации, что позволяет определять молекулярную массу.

Можно показать, что для смесей молекул наблюдаемый в опыте коэффициент σ представляет собой средневесовое значение по всем растворенным компонентам исходного раствора. Как метод гель-хроматография особенно полезна при изучении взаимодействующих систем. Тех, кто хочет подробнее ознакомиться с таким подходом, мы отсылаем к обзору Экерса (Ackers, 1975).

12.4. Электрофорез

Если макромолекула обладает суммарным зарядом q и находится в электрическом поле E , то на нее действует сила $F = qE$. Под действием этой силы молекула (частица) движется в жидкой среде с ускорением до тех пор, пока не установится некоторая скорость v , отвечающая стационарному режиму. При этой скорости действующие на частицу силы трения и внешняя сила равны по величине и противоположны по направлению; отсюда

$$v = qE/f \quad (12.67)$$

Для сферической молекулы радиуса a , заряд которой равен ze (где e — заряд электрона), имеем

$$v = zeE/6\pi\eta a \quad (12.68)$$

В однородном электрическом поле, которое возникает, например, между двумя параллельными пластинами, молекула движется прямолинейно. Аналогично тому как мы определяли коэффициент седиментации, мы можем определить подвижность u как скорость в единичном поле: $u = v/E$.

К сожалению, такое упрощенное описание электрофореза (т.е. явления переноса заряженных частиц под действием электрического поля) совершенно не соответствует реальной картине. Сразу же возникает вопрос: что мы, собственно, называем суммарным зарядом макромолекулы?

РАСЧЕТ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЙ ПОДВИЖНОСТИ

В любом водном растворе полимера присутствуют низкомолекулярные ионы. Часть из них связана с полимером довольно сильно, другие слабее. Что произойдет, если поместить в электрическое поле положительно заряженную макромолекулу и ровно столько анионов, сколько нужно для того, чтобы нейтрализовать ее заряд? Макромолекула будет стремиться мигрировать в одну сторону, а противоионы — в противоположную. Энергия, которую пришлось бы затратить на преодоление электростатического притяжения при разделении любого суммарного заряда, чрезвычайно велика, поэтому происходящая на самом деле общая миграция будет незначительна. Если результирующая подвижность не равна нулю, то ее величина будет представлять собой некоторое среднее значение от

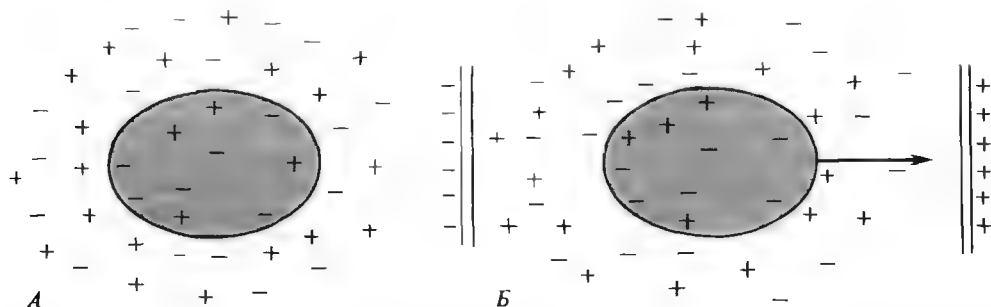


РИС. 12.17. Молекула белка, обладающая отрицательным суммарным зарядом, с окружающей ее атмосферой противоионов. *А.* В отсутствие внешнего электрического поля. *Б.* В процессе миграции под действием изображенного здесь внешнего электрического поля. Обратите внимание на то, что под влиянием поля ионное облако деформировалось. Показано также, что изменился характер распределения зарядов в самом белке; это не обязательное следствие наложения внешнего поля, но такое предположение вполне разумно.

подвижностей макромолекул и противоионов точно так же, как в случае диффузии электролитов (гл. 10). Чтобы ослабить взаимодействие между разноименно заряженными ионами, можно было бы и здесь добавить в раствор большое количество поддерживающего электролита. В случае диффузии подобный прием позволил разрешить все затруднения, но при электрофорезе это приводит к новым трудностям. Теперь электролит образует ионную атмосферу вокруг полимера; у нас есть два подхода, позволяющие учесть этот эффект. При одном подходе считают, что ионная атмосфера уменьшает эффективный суммарный заряд полимера, поскольку к полимеру притягиваются противоположно заряженные ионы (противоионы) (рис. 12.17). При другом предполагают, что ионная атмосфера порождает электрическое поле, в котором находится полимер и которое при расчете подвижности макромолекулы следует учитывать наряду с любым внешним полем.

Принято описывать эту атмосферу с помощью непрерывного распределения, игнорируя дискретный характер зарядов. Электростатический потенциал Φ на расстоянии r от равномерно заряженной сферы радиуса a в среде с диэлектрической проницаемостью ϵ имеет вид

$$\Phi = ze/\epsilon r \quad \text{для } r > a \quad (12.69)$$

Решая приближенную форму уравнения Пуассона—Больцмана для той же сферы в растворе электролита, можно показать (Rice, Nagasawa, 1961), что

$$\Phi = (ze/\epsilon r) \exp [\kappa(a - r)] / (1 + \kappa a) \quad (12.70)$$

где κ (параметр экранирования, имеющий размерность длины в минус первой степени) определяется по формуле

$$\kappa = (8\pi N_0 e^2 / 1000 \epsilon k T)^{1/2} I^{1/2} \quad (12.71)$$

Ионная сила I представляет собой сумму по всем типам ионов, присутствующих в растворе, вида

$$I = \frac{1}{2} \sum_i C_i z_i^2 \quad (12.72)$$

где z_i — величина заряда, а C_i — молярная концентрация ионов данного типа. Параметр κ показывает, насколько быстрее убывает с расстоянием потенциал некоторого иона в рас-

гворе по сравнению с тем гипотетическим случаем, когда противоионы отсутствуют. Очевидно, чем больше ионная сила, тем более эффективно экранируется потенциал иона.

Для случая, когда потенциал экранированного иона остается постоянным во внешнем электрическом поле, путем сложных расчетов (но при относительно небольшом числе допущений) было получено аналитическое выражение для электрофоретической подвижности сферической молекулы радиуса a :

$$u = (ze/6\pi\eta a)X_1(ka)/(1 + ka) \quad (12.73)$$

где $X_1(ka)$ — функция, протабулированная Генри (Rice, Nagasawa, 1961). Однако во внешнем поле, за счет происходящих в нем движений макроиона и малых ионов, ионное облако деформируется (рис. 12.17). В результате потенциал нельзя описать формулой (12.70). Учет всех этих эффектов представляет собой очень трудную задачу. В результате таких расчетов получается формула, содержащая помимо главного члена, выражаемого формулой (12.73), еще много дополнительных членов. Наиболее удовлетворительно эта задача рассмотрена Бутом (более подробно об этом см. Rice, Nagasawa, 1961). Согласно упрощенной теории, которая приводит к формуле (12.73), подвижность макроиона прямо пропорциональна его заряду. Более полные теории показывают, что при достаточно больших z подвижность будет меньше того значения, которое предсказывает формула (12.73), и может даже убывать при возрастании z .

Теория Бута, несмотря на всю ее сложность, не в состоянии удовлетворительно объяснить экспериментальные данные по электрофорезу макромолекул. Она хорошо описывает лишь случай равномерно заряженной сферы, а такая модель является очень плохим представлением белка или нуклеиновой кислоты. Вообразите эллипсоид с асимметричным распределением зарядов по объему. Электрическое поле вызовет появление на нем вращающего момента и перемещение его как целого. При этом возникнет преимущественная ориентация, и движение макромолекулы уже не сможет более описываться средним по всем ориентациям значением коэффициента трения. Более того, все эти эффекты влияют на характер распределения зарядов в ионном облаке.

ПРИМЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Несмотря на все перечисленные трудности, электрофорез является действенным и удобным средством анализа и разделения белков и нуклеиновых кислот, если не требовать от него количественных данных о структуре молекул. Все теории предсказывают в полном согласии, что подвижность прямо пропорциональна отношению суммарного заряда к коэффициенту трения. Такая зависимость позволяет использовать электрофорез для получения информации об относительной величине заряда (для молекул, которые имеют одинаковые размеры и форму) или об относительных размерах (для молекул с одинаковыми зарядами). Наиболее распространено применение электрофореза для разделения и качественного анализа смесей молекул, опирающееся на различия в размерах и форме отдельных компонентов.

При электрофорезе с движущейся границей (или свободном электрофорезе) к толстому слою раствора макромолекул прикладывают электрическое поле и регистрируют общее перемещение макромолекул в этом слое. В результате электрофореза макромолекулы движутся как одна широкая зона, в результате диффузии происходит размывание ее границы. Этот тип электрофореза легче всего поддается математическому описанию. За процессом разделения можно следить с помощью прямых оптических методов регистрации, как в случае диффузии или седиментации. Однако как препаративный метод электрофорез с движущейся границей не очень удобен, поскольку, как и при скоростной седиментации, здесь разделение происходит фактически только на границе зоны. Различные артефакты,

коивекция, экспериментальные трудности и эффекты многокомпонентности снижают его ценность как общего аналитического метода.

Эти проблемы можно свести к минимуму при зональном электрофорезе, где (как и в методе зонального центрифугирования) макромолекулы присутствуют вначале лишь в очень тонком слое. Конвекцию можно подавить с помощью градиента плотности, но гораздо большее распространение получил электрофорез в твердотельном носителе, насыщенном буфером. Некоторые носители лишь слабо или неспецифически реагируют с макромолекулярными компонентами раствора; к ним относятся бумага, целлюлоза для тонкослойной хроматографии и ацетат целлюлозы. В других материалах при движении молекул происходит отставание молекул одних типов от молекул других типов; к ним относятся полиакриламидные и агарозные гели (в которых происходит сортировка молекул по размерам) и бумажные ионообменники (в которых осуществляется избирательная задержка заряженных молекул).

При наличии твердотельного носителя количественный анализ результатов измерения подвижности становится почти невозможным. Ко всем вышеупомянутым трудностям прибавляется еще то обстоятельство, что молекуле приходится следовать по извилистой траектории в теле носителя. В результате трудно установить корреляцию между наблюдаемой в опыте результирующей подвижностью и фактической подвижностью молекул. Еще больше осложняют дело те или иные особенности взаимодействия с поверхностью носителя, такие, например, как установление равновесия между связанным и свободным состояниями растворенного вещества.

Существуют, однако, две разновидности зонального электрофореза, которые могут дать некоторую количественную информацию о молекулах. В основе одной из них лежит тот факт, что величина заряда белка или иной макромолекулы зависит от pH. Изучение электрофоретической подвижности как функции pH позволяет найти изоэлектрическую точку молекулы. Это такое значение pH, при котором средний суммарный заряд частицы равен нулю. Подвижность в изоэлектрической точке также равна нулю. Более того, частица движется к катоду, если pH меньше значения, соответствующего ее изоэлектрической точке, или в противоположную сторону, если pH больше этого значения.

Было бы утомительно проводить серию электрофоретических опытов при различных близких друг к другу значениях pH. Разумной альтернативой такой постановки опыта служит электрофорез в градиенте pH. Этот вариант метода, называемый изоэлектрическим фокусированием, является прямым аналогом равновесного центрифугирования в градиенте плотности. Молекулы, несущие и положительные и отрицательные заряды, называют амфолитами; к ним относятся, например, полимеры, содержащие многочисленные амино- и карбоксильные группы. Смесь амфолитов с широким спектром изоэлектрических точек вводят в колонку и ожидают, пока она не распределится по колонке под действием электрического поля. Таким способом достигается стабилизация градиента pH, в котором каждый конкретный амфолит оказывается около своей изоэлектрической точки. Для того чтобы избежать потерь биологического материала на аноде или катоде, на обоих концах градиента устанавливают такие значения pH, при которых у биологических материалов не может быть изоэлектрических точек. Чтобы подавить конвекцию, градиент pH создают в твердотельном носителе. В эту систему добавляют небольшое количество белка. Он мигрирует, пока не достигнет pH, соответствующего его изоэлектрической точке. Там он и концентрируется, образуя узкую зону. Чтобы проанализировать результаты такого опыта, можно просканировать гель и измерить поглощение белка; можно также окрасить белок либо нарезать гель на тонкие слои и измерить в каждом слое pH, содержание белка, ферментативную активность или радиоактивность.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ПРИСУТСТВИИ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА НАТРИЯ КАК МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС

Второй, очень популярный, метод — это зональный электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН). Здесь основная идея состоит в том, чтобы превратить все белки в молекулы со сходной структурой, которые отличались бы друг от друга лишь значениями молекулярной массы. ДСН — сильный денатурирующий агент по отношению к белку. Он связывается со всеми белками в первом приближении одинаково: примерно 1,4 г на 1 г аминокислот. Каждая молекула ДСН несет один отрицательный заряд. Благодаря такому количеству ДСН в комплексе ДСН—белок общая плотность зарядов в комплексе более или менее одинакова для самых разных белков, несмотря на вариации в величине заряда последних. В систему добавляют восстанавливающие агенты, такие как β -меркаптоэтанол, для того чтобы разорвать все дисульфидные мостики — как внутри цепей, так и между разными цепями. В этих условиях уже ничто не мешает молекулам белка после денатурации находиться в тех равновесных формах, которые обусловлены взаимодействиями в комплексе ДСН—белок. Изучением структуры ДСН-белковых комплексов занимались Тэнфорд с сотрудниками. Гидродинамические измерения показали, что эти комплексы представляют собой вытянутые эллипсоиды или стержни постоянного сечения, диаметр которых составляет примерно 18 Å, а длина и молекулярная масса связаны линейной зависимостью.

В качестве носителя при электрофорезе в присутствии ДСН обычно применяют полиакриламидные гели. Эти гели можно приготовить при различных значениях отношения

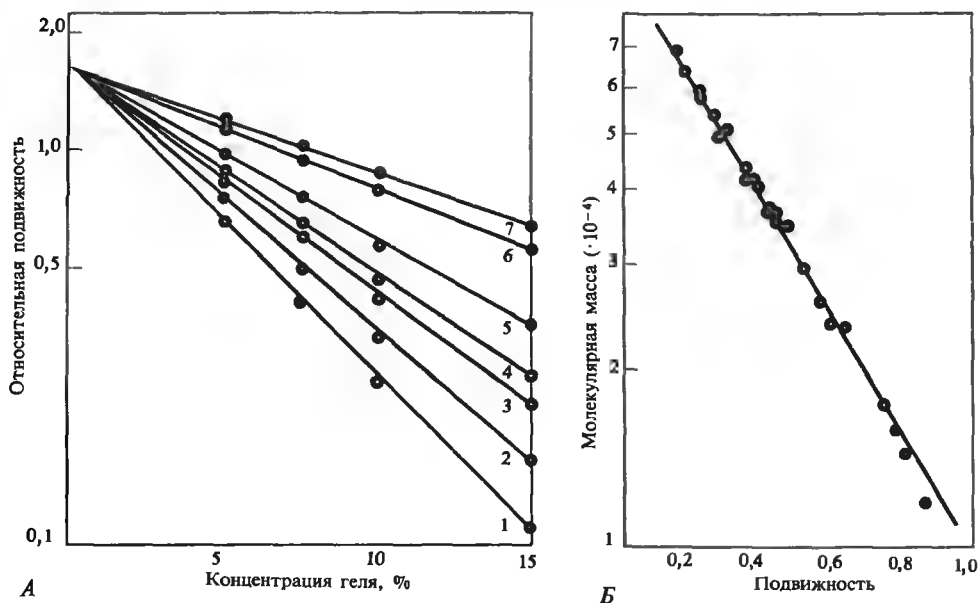


РИС. 12.18. Электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии ДСН. А. Относительная подвижность семи различных белков как функция концентрации акриламидного геля. Значения молекулярных масс белков лежат в диапазоне от 14 000 для белка оболочки бактериофага R17 (кривая 7) до 60 000 для каталазы (кривая 1). Б. Относительная подвижность различных белков в 10% акриламидных гелях как функция молекулярной массы. (Weber K., Osborn M., 1975.)

сухой массы геля к массе растворителя. Практика показывает, что чем больше концентрация геля, тем меньше величина кажущейся электрофоретической подвижности. Если аккуратно выполнить измерения, то мы получим удивительный результат (рис. 12.18, А). Для целого ряда однотипных белков подвижности, экстраполированные к нулевой концентрации геля, совпадают. Результаты измерений можно описать зависимостью вида

$$\ln u(C) = -k_x C + \ln u(0) \quad (12.74)$$

где $u(C)$ — величина кажущейся подвижности при концентрации геля C (в процентах), k_x — коэффициент, зависящий от концентрации сшивок в матрице геля, а также от формы и молекулярной массы соответствующего белка, а $u(0)$ — величина, постоянная для некоторой группы одностилных молекул.

Подвижность при нулевой концентрации геля должна отвечать истинной электрофоретической подвижности ДСН-белковых комплексов, на которой не сказываются никакие взаимодействия с гелем. Упрощенной теории электрофореза, кратко изложенной выше, достаточно, чтобы мы могли понять, почему $u(0)$ — величина постоянная. Если в ДСН-белковых комплексах весовое содержание ДСН сохраняется на постоянном уровне и можно пренебречь зарядом самого белка, то суммарный заряд z комплекса прямо пропорционален молекулярной массе и тем самым длине l комплекса, так как последний имеет форму стержня. Коэффициент трения также приблизительно пропорционален массе молекулы; это видно из формулы $f = 6\pi\eta V_{\text{гидр}}^{1/3} F$. Для стержнеобразной молекулы объем гидратированной формы прямо пропорционален ее длине. Фактор формы F можно оценить с помощью уравнения (10.19а) для вытянутых эллипсоидов. При очень больших значениях a/b $F = (a/b)^{2/3} \ln(a/b)$. Но отношение осей в случае стержня просто пропорционально его длине, так что $f \propto l^{1/3} \cdot l^{2/3} / \ln l \cong l$ для больших l . Таким образом, поскольку подвижность $u(0) \propto z/f$, она не зависит от молекулярной массы молекулы. Поэтому оказывается, что при электрофорезе в присутствии ДСН действие электрического поля просто сводится к тому, что на все такие молекулы накладывается общий дрейф с постоянной скоростью. А их разделение, опирающееся на разницу в значениях молекулярных масс, объясняется спецификой взаимодействия стержневидных ДСН-белковых комплексов разных размеров с несущей матрицей геля.

Уравнение (12.74) показывает, что подвижность молекул падает по мере того, как уменьшается содержание растворителя в геле. Структура самого геля ничем не отличается от структуры зерна, изображенного на рис. 12.14. Однако гель заполняет весь объем системы, там нет никаких свободных от геля областей вроде тех, что имеются между зернами в колонке для гель-хроматографии. Когда электрическое поле вынуждает молекулы двигаться в толще геля, то для самых мелких из них находится, как правило, достаточно большое число пор, через которые они могут мигрировать. Более крупным молекулам придется пройти большее миграционное расстояние, поскольку не все поры из предыдущего множества достаточно велики для того, чтобы пропустить их. Отсюда следует, что при движении в геле у более крупных молекул результирующая подвижность меньше. Уравнение (12.58) показывает, что коэффициент распределения σ прямо пропорционален части площади поперечного сечения, доступной для данного растворенного вещества, поскольку для сплошного геля «свободная» площадь α равна нулю. Поэтому результирующая подвижность должна быть пропорциональна σ . Тогда, учитывая уравнение (12.66а), мы можем предсказать зависимость вида

$$u = b - a \lg M \quad (12.75)$$

Коэффициент b должен зависеть от подвижности $u(0)$ при нулевой концентрации геля, а также от характера распределения пор в геле по их размерам. Параметр a должен быть функцией концентрации геля C , что следует из условия совместимости уравнений (12.74) и (12.75).

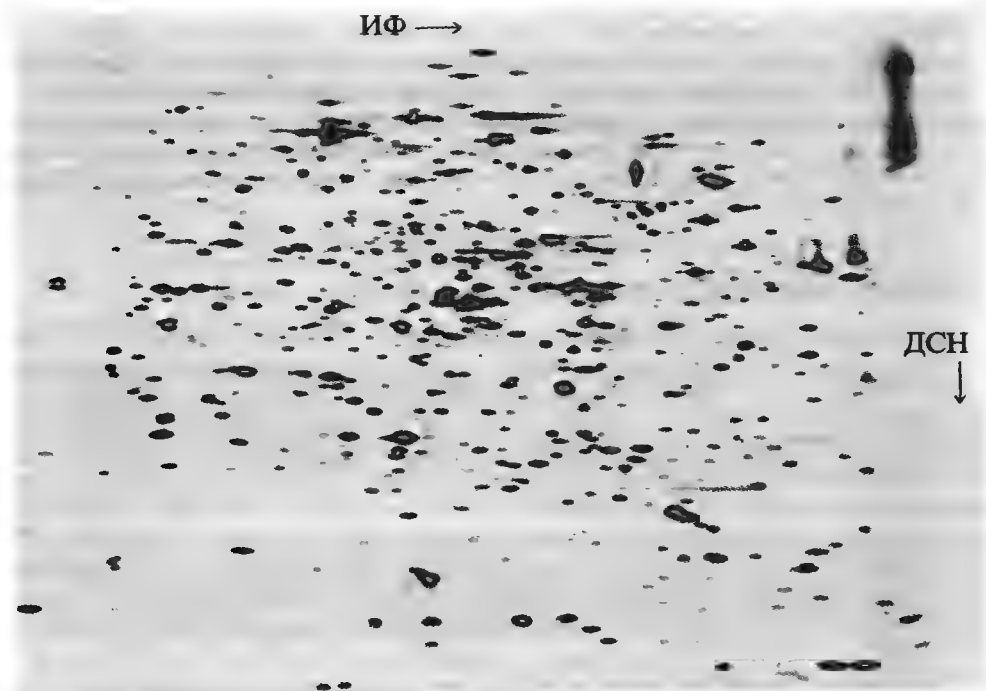


РИС. 12.19. Двумерный электрофорез в геле, получающийся при наложении ДСН-электрофореза на изоэлектрическое фокусирование. Сначала исследуемый материал подвергают электрофорезу в одномерном геле с градиентом рН (изоэлектрическое фокусирование). Затем эту полоску с гелем прикладывают к одной из сторон квадратной пластины геля с ДСН, в котором исследуемое вещество движется под прямым углом к направлению движения в первом геле. Картина, которая здесь изображена, получена для суммарного белка *E. coli*; регистрация ведется с помощью радиоавтографии. Подробное описание этой методики содержится у О'Фаррела. [Радиоавтограмма приведена с любезного разрешения Патрика О'Фаррела. O'Farrell P., J.Biol. Chem., 250, 4007 (1975).]

Наблюдаемые на опыте подвижности белков при электрофорезе в присутствии ДСН зависят от молекулярной массы в полном соответствии с уравнением (12.75). На рисунке 12.18,Б показаны типичные результаты таких измерений. Те же рассуждения, которые мы привели при обсуждении электрофореза белков в присутствии ДСН, годятся и для случая нуклеиновых кислот в обыкновенных водных буферах. Однако очень длинные молекулы уже нельзя рассматривать как жесткие стержни. В этом случае следует пользоваться аналогом уравнения (12.75), в котором вместо молекулярной массы фигурирует эффективный радиус гидратированной формы клубкообразной молекулы. Отградуировав систему с гелем, мы сможем определить $V_{\text{гидр}}$, величина которого в сочетании с седиментационными данными позволит нам получить правильное значение молекулярной массы точно так же, как это было описано ранее в разделе, посвященном гель-хроматографии.

Главное преимущество электрофореза в геле перед гель-хроматографией состоит в том, что в продолжение всего процесса зоны имеют очень резкие границы, поскольку нет никаких свободных от геля областей, где диффузия могла бы протекать быстро. Разделительная способность электрофореза в присутствии ДСН опирается лишь на разницу в моле-

кулярных массах, а при изoeлектрическом фокусировании целиком зависит от зарядов молекул. Логично предположить, что если бы нам удалось объединить оба метода в одну разделительную схему, то ее разрешающая способность была бы весьма значительной. Это достигается посредством двумерного электрофореза, при котором в одном направлении происходит электрофорез в присутствии ДСН, а в другом — изoeлектрическое фокусирование. На рис. 12.19 показан пример применения подобной процедуры, взятый из работы О'Фаррела. Один аналитический опыт позволяет идентифицировать более 1000 различных белков из *E. coli*.

Краткие выводы

Характеристическая вязкость является мерой прироста вязкости раствора за счет присутствия в нем растворенных макромолекул¹⁾. Характеристическая вязкость сферических частиц не зависит от их массы, но в общем случае она очень чувствительна к форме и конформации молекул. Характеристические вязкости в случае вытянутых эллипсоидов вращения гораздо больше соответствующих значений для сплюснутых эллипсоидов²⁾. Довольно надежные оценки молекулярных масс можно получать на основе параллельных измерений седиментации и вязкости. При измерении вязкости в растворах, содержащих очень длинные молекулы, получаемые значения весьма заметно зависят от величины градиента скорости (скорости сдвига) в измерительном приборе. За счет сдвиговых напряжений может происходить обратимое изменение средней конформации цепей больших ДНК. Этот эффект лежит в основе измерений молекулярных масс методом упруговязкой релаксации.

Информацию о размерах и форме молекул можно получить также, измеряя некоторые характеристики, связанные с их вращательным движением. При одном подходе стараются найти анизотропное равновесное распределение молекул по ориентациям, установившееся под действием какой-либо внешней силы. Обычно в качестве таких сил, под действием которых возникает анизотропное распределение, выступают сдвигающие усилия или электрические поля. Используя другой подход, стараются проследить кинетику исчезновения такого распределения, наблюдаемую при обратном его переходе в состояние изотропного раствора с момента отключения внешней силы. Для регистрации анизотропного распределения, в частности, используют два метода: линейный дихроизм и двойное лучепреломление.

Гель-хроматография — простой, но чрезвычайно эффективный метод, позволяющий определять размеры молекул, а также фракционировать молекулы на основе различий в размерах. Молекула, которая не может проникать в поры молекулярного сита, движется быстрее вдоль колонки, чем молекула меньших размеров. Еще одним чрезвычайно полезным инструментом, применяемым для очистки и качественного анализа смесей макромолекул, служит электрофорез. Довольно трудно получить аналитическое выражение, связывающее наблюдаемую в опыте электрофоретическую подвижность с зарядом и формой молекулы. Однако в некоторых специальных случаях электрофорез дает количественную информацию. Пользуясь методом изoeлектрического фокусирования, находят рН изoeлектрических точек белков. А воспользовавшись электрофорезом в носителе, представляющем собой молекулярное сито, можно крайне просто определять молекулярную массу белков (в присутствии ДСН) или нуклеиновых кислот.

1) В пересчете на единицу концентрации последних. — *Прим. ред.*

2) При одной и той же величине отношения осей. — *Прим. ред.*

Задачи

12.1. В каждый из трех сосудов помещают одинаковое количество смолы, используемой в качестве молекулярного сита. Добавляют растворитель в количестве, достаточном для того, чтобы поверх зерен геля образовался еще некоторый свободный от геля верхний слой. В первый сосуд добавляют N_B молей белка, во второй — N_L молей молекул низкомолекулярного вещества (лиганда), в третий — и то и другое вместе. После того как все приходит в равновесие, в верхнем слое измеряют концентрации лиганда и белка. Покажите, что можно рассчитать среднее число связанных лигандов, приходящееся на одну молекулу белка. Можете считать, что белок и все комплексы белка с лигандом совершенно не проникают внутрь геля, в то время как для свободных молекул лиганда доступен весь объем внутренних областей геля.

12.2. Найдите коэффициент гидратации вируса табачной мозаики, если измерения характеристической вязкости дают величину $[\eta] = 37 \text{ см}^3/\text{г}$ и известно, что отношение осей составляет 18:1 (случай вытянутого эллипсоида). Можете считать, что значение парциального удельного объема близко к нижнему пределу области, характерной для белков, поскольку вирус более чем на 90% по весу состоит из белка.

12.3. Белок может существовать в двух формах, мономерной и димерной. Мономер представляет собой сплюснутый эллипсоид вращения, но надежные измерения его отношения осей не проводились. Коэффициент диффузии мономера в 1,96 раза больше коэффициента диффузии димера. Характеристическая вязкость димера в 6,45 раза превышает соответствующее значение для мономера. Каково отношение осей у димера? Можете считать, что (а) значение парциального удельного объема у мономера и димера одно и то же, (б) у мономера и димера одинаковая степень гидратации и (в) все опыты проводятся в воде при 25°C.

12.4. Рассчитайте угол между осью поляризатора и зоной с нулевым пропусканием, который следует ожидать для миозина в опыте по измерению двойного лучепреломления в потоке, если градиент скорости равен 4000 с^{-1} . (Необходимые сведения о миозине приведены в табл. 12.1.)

12.5. Объясните, почему при электрофорезе в геле в присутствии ДСН наблюдается аномальное поведение белков, мол. масса которых меньше 15 000. (Градуировочные кривые, устанавливающие соответствие между подвижностью и M и полученные для белков с большей молекулярной массой, непригодны для этих малых белков.)

ЛИТЕРАТУРА

Общая

- Ackers G. K., 1975. Molecular sieve methods of analysis. In: The Proteins, 3rd ed., H. Neurath and R. L. Hill, eds., Academic Press, New York, vol. 1, p. 1.
Tanford C., 1961. Physical Chemistry of Macromolecules, Wiley, New York. (Тенфорд Ч. Физическая химия полимеров. — М.: Химия, 1965.)

Специальная

Bloomfield V., Crothers D., Tinoco I., Jr., 1974. *Physical Chemistry of Nucleic Acids*, Harper & Row, New York.

Charney E., 1971. Linear dichroism with emphasis on electric field-induced linear dichroism. In: *Procedures in Nucleic Acid Research*, ed. G. C. Cantoni and D. R. Davies, Harper & Row, New York, v. 2, p. 176.

Eisenberg H., 1976. *Biological Macromolecules and Polyelectrolytes in Solution*, Clarendon Press, Oxford.

(Полезное пособие, рассчитанное на подготовленного читателя.)

Kasai M., Oosawa F., 1972. Flow birefringence. In: *Methods in Enzymology*, ed. C.H.W. Hirs and S. W. Timasheff, Academic Press, New York, v. 26, p. 289.

Klotz L. C., Zimm B. H., 1972. Size of DNA determined by viscoelastic measurements: Results on bacteriophages, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.* 72, 779.

Rice S. A., Nagasawa M., 1961. *Polyelectrolyte Solutions*, Academic Press, New York.

Righetti P. G., Drysdale J. W., 1976. *Isoelectric Focusing*, North-Holland, New York.

Van Holde K. E., 1971. *Physical Biochemistry*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J.

Weber K., Osborn M., 1975. Proteins and sodium dodecyl sulfate: Molecular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures. In: *The Proteins*, 3rd ed., ed. H. Neurath and R. L. Hill, Academic Press, New York, v. 1, p. 179.

Yamakawa H., 1971. *Modern Theory of Polymer Solutions*, Harper & Row, New York.

Zimm B. H., 1971. Measurement of viscosity of nucleic acid solutions. In: *Procedures in Nucleic Acid Research*, ed. G.C. Cantoni and D. R. Davies, Harper & Row, New York, v. 2, p. 245.

Глава 13 Рентгеновская кристаллография

13.1. Рассеяние рентгеновских лучей атомами и молекулами

Дифракция рентгеновских лучей — самый эффективный современный метод изучения структуры больших молекул. Во многих случаях рентгеноструктурный анализ кристаллов белков или нуклеиновых кислот позволил полностью определить третичную структуру этих молекул с разрешением 3 Å или лучше. Дифракция рентгеновских лучей дает богатую структурную информацию и тогда, когда образцы (например, ориентированные волокна) обладают меньшей, чем у кристаллов, упорядоченностью. Эта информация не позволяет однозначно определить структуру молекул, но она может служить в качестве решающего теста при выборе той или иной модели структуры. Ниже мы излагаем теорию дифракции рентгеновских лучей и знакомим читателя с некоторыми этапами определения структуры по дифракционным данным.

ОСОБЕННОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ НАШЕГО РАССМОТРЕНИЯ

Можно ожидать, что метод, позволяющий столь детально устанавливать структуру, должен быть довольно сложным. Мы по возможности опустим многие сложные детали и попытаемся сосредоточить внимание на наиболее существенных особенностях метода рентгеновской дифракции. Так, мы рассматриваем неподвижные атомы, тогда как даже в кристаллах движение атомов при конечных температурах весьма существенно. Мы считаем, что идеальная упорядоченность характерна для всего кристалла в целом, хотя в действительности она может существовать лишь на уровне отдельных кристаллических блоков. Рентгеновское излучение мы считаем монохроматичным, хотя на практике всегда имеют дело с некоторым распределением длин волн. Наконец, мы полагаем, что дифракционные данные очень точны, хотя на самом деле экспериментальные ошибки часто оказываются серьезной проблемой.

Чтобы понять природу дифракции рентгеновских лучей, надо знать, как они взаимодействуют с атомами и какой может быть организация атомов в кристаллах. Наиболее традиционные изложения метода рентгеновской дифракции начинаются с описания симметрии кристаллов и их структуры, причем дифракция описывается в терминах отражения от кристаллических плоскостей, и лишь позднее рассматривается структура молекул, образующих кристалл. Читатель, вероятно, встречался с таким подходом в более элементарных изданиях, мы же избрали иной подход, разработанный Липсоном и Тейлором (H. Lipson, C. Taylor, 1958). Сначала мы рассматриваем рассеяние рентгеновских лучей на отдельных атомах, затем усложняем рассмотрение, переходя к рассеянию на одномерной атомной решетке, а в конце концов и на трехмерной кристаллической структуре. Хотя такой подход требует несколько более сложного математического аппарата, кристаллографы-практики, по-видимому, сходятся на том, что при этом удастся гораздо глубже проникнуть в суть явления.

РЕНТГЕНОВСКИЕ ЛУЧИ — КОРОТКОВОЛНОВОЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ

Рентгеновские лучи — это фотоны с длинами волн от 0,1 до 100 Å. Обычно они испускаются при бомбардировке мишени электронами с энергией 10 000 электрон-вольт (эВ)

или выше. При столкновении эти электроны высокой энергии могут выбивать электроны из атомов мишени, вызывая появление вакансий в атомных оболочках. Если, например, вакансия возникает в ближайшей к ядру K -оболочке атома, она быстро заполняется электроном с соседней L -оболочки или со следующей за ней M -оболочки. Фотоны, излучаемые в результате этих переходов, называются соответственно K_α - и K_β -фотонами. Ответающие им длины волн равны

$$\lambda_{K_\alpha} = hc/(E_L - E_K) \quad \text{и} \quad \lambda_{K_\beta} = hc/(E_M - E_K) \quad (13.1)$$

где h — постоянная Планка, c — скорость света в вакууме, E — энергии соответствующих состояний (K , L или M). Чаще всего в рентгеноструктурном анализе используются K_α -излучение Cu ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$) и K_α -излучение Mo ($\lambda = 0,71 \text{ \AA}$).

ПАРАМЕТРЫ, ОПИСЫВАЮЩИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНУЮ ВОЛНУ

Рентгеновские лучи, так же как и другие фотоны, суть электромагнитные волны. Распространение такой волны во времени и в пространстве в направлении $\mathbf{k}$ описывается следующим общим выражением:

$$\begin{aligned} E(\mathbf{r}, t) &= E_0 e^{2\pi i(\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}/\lambda - vt + \delta')} = \\ &= E_0 \{ \cos[2\pi(\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}/\lambda - vt + \delta')] + i \sin[2\pi(\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}/\lambda - vt + \delta')] \} \end{aligned} \quad (13.2)$$

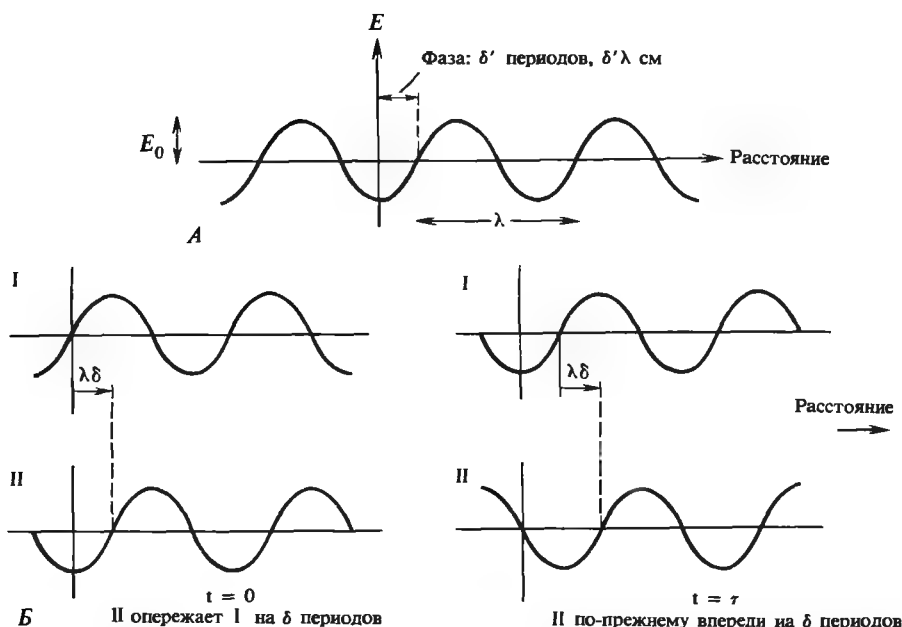


РИС. 13.1. Характеристики электромагнитных волн. А. Напряженность электрического поля E как функция расстояния в нулевой момент времени. Б. Разность фаз двух волн остается постоянной во времени. Разность фаз равна δ периодам (или $\lambda \delta$ см) как в момент времени $t = 0$, так и в момент времени t .

$\mathbf{E}(\mathbf{r}, t)$ — электрическое поле в точке $\mathbf{r}$ в момент времени t , $\hat{\mathbf{k}}$ — единичный вектор в направлении $\mathbf{k}$, λ — длина волны (см), ν — частота (с^{-1}), δ' — начальная фаза волны, которая определяет величину электрического поля в точке $\mathbf{r} = 0$ в момент времени $t = 0$; E_0 — амплитуда волны, т.е. максимальное значение величины электрического поля (рис. 13.1). Такая поперечная волна периодически осциллирует как во времени, так и в пространстве.

Столь же корректно представлять волну не комплексной, а действительной функцией, например, как $\sin[2\pi(\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}/\lambda - \nu t + \delta')]$ (Дополнение 13.1). Однако независимо от выбранного представления измеряемая на опыте интенсивность излучения, переносимого волной, зависит от квадрата амплитуды и всегда будет величиной действительной. Мы будем описывать рентгеновское излучение комплексными экспонентами, поскольку при этом существенно упрощаются математические выкладки. Например, $e^{a+b} = e^a e^b$, тогда как $\sin(a+b) = \sin a \cos b + \cos a \sin b$.

Две волны, распространяющиеся в одном направлении, с равными амплитудами, длинами волн и частотами могут различаться только начальными фазами. Представим их в виде

$$E_1(\mathbf{r}, t) = E_0 e^{2\pi i(\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}/\lambda - \nu t + \delta_1)}$$

$$E_2(\mathbf{r}, t) = E_0 e^{2\pi i(\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}/\lambda - \nu t + \delta_2)} = E_1(\mathbf{r}, t) e^{2\pi i\delta}$$

где $\delta = \delta_2' - \delta_1'$ — сдвиг фазы. Заметим, что сдвиг δ постоянен всюду в пространстве и во времени. Если две такие смещенные по фазе волны налагаются друг на друга, то результирующая волна будет иметь вид $E_1(\mathbf{r}, t)(1 + e^{2\pi i\delta})$. При $\delta = 0$ у результирующей волны будет просто удвоенная амплитуда; при $\delta = 1/2$ результирующая амплитуда обращается в нуль, так как $e^{i\pi} = -1$. Ясно, что при суперпозиции многих волн результат полностью определяется их относительными фазами.

Дополнение 13.1

СООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ СИНУСАМИ, КОСИНУСАМИ И ЭКСПОНЕНТАМИ

Периодически изменяющиеся функции можно представить в виде синусов, косинусов или комплексных экспонент. Основное соотношение между этими двумя представлениями выглядит так:

$$e^{ix} = \cos x + i \sin x$$

Один из простых способов убедиться в его справедливости — разложить каждую из функций в бесконечный ряд:

$$e^{ix} = 1 + ix - x^2/2! - ix^3/3! + x^4/4! + ix^5/5! - \dots$$

$$\cos x = 1 - x^2/2! + x^4/4! - x^6/6! + \dots$$

$$i \sin x = ix - ix^3/3! + ix^5/5! - ix^7/7! + \dots$$

Поскольку $\cos(-x) = \cos x$, а $\sin(-x) = -\sin x$, очевидно, что

$$e^{-ix} = \cos x - i \sin x$$

Следовательно, тригонометрические функции всегда можно представить в виде комплексных экспо-

НЕНТ

$$\cos x = (1/2)(e^{ix} + e^{-ix})$$

$$\sin x = (1/2i)(e^{ix} - e^{-ix})$$

ГЕОМЕТРИЯ ОПЫТА ПО РАССЕЯНИЮ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ

Рассмотрим геометрию типичного эксперимента по рассеянию рентгеновских лучей (рис. 13.2, А). Параллельный пучок рентгеновских лучей падает на образец (в данном случае это один электрон), расположенный в начале системы координат. Направлению падающего пучка соответствует единичный вектор $\hat{s}_0$. Некоторая часть излучения, падающего

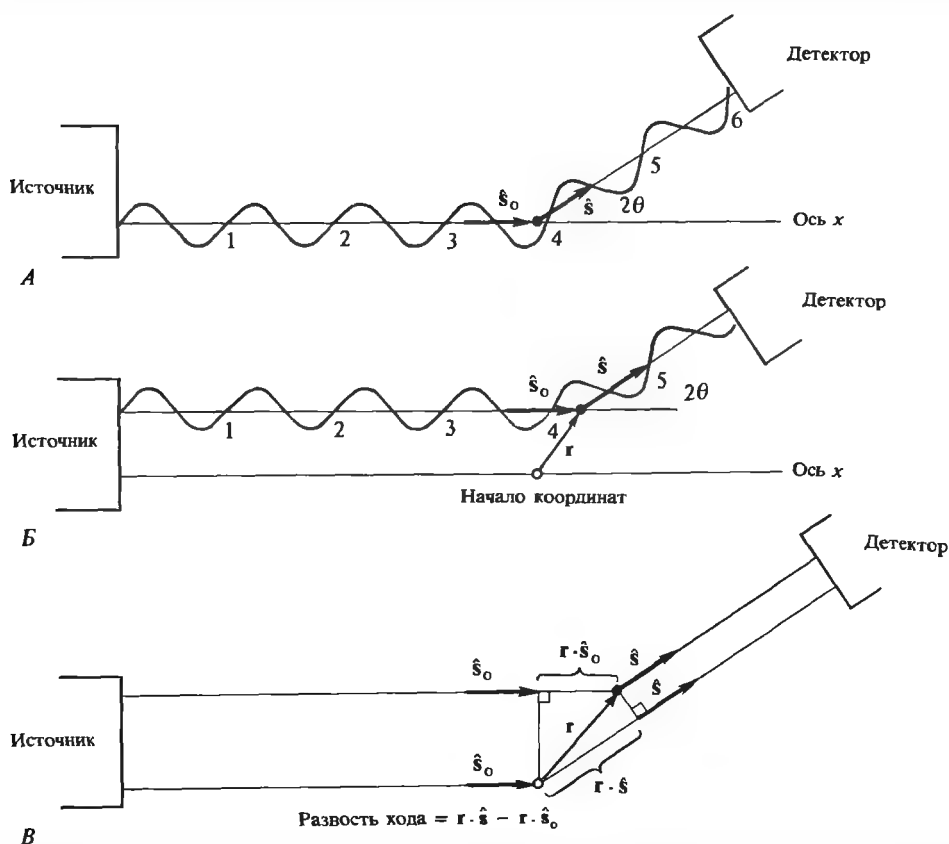


РИС. 13.2. Рассеяние рентгеновских лучей одним электроном. Угол отклонения рассеянного излучения (2θ) от первоначального направления одинаков во всех трех случаях. А. Электрон находится в начале координат. Б. Электрон расположен в точке с радиусом-вектором $\mathbf{r}$. В. Схема, иллюстрирующая разность хода лучей, рассеянных электроном, расположенным в точке $\mathbf{r}$ и в начале координат. Числа (на А и Б) — длины пути излучения в единицах длин волн. $\hat{s}_0$ и $\hat{s}$ — единичные векторы в направлении падающего и рассеянного лучей соответственно.

на образец, рассеивается им во всех направлениях. Представим себе, что мы поместили в определенном положении детектор рентгеновского излучения, с помощью которого измеряется амплитуда и фаза излучения, рассеянного в направлении детектора, которому соответствует единичный вектор $\hat{\mathbf{s}}$. Половину угла отклонения, т.е. угла между вектором $\hat{\mathbf{s}}$ и вектором $\hat{\mathbf{s}}_0$, обозначим через θ и назовем углом рассеяния (рис. 13.2, А). Мы рассматриваем здесь только упругое рассеяние рентгеновских лучей. Это означает, что длины волн падающего и рассеянного излучения одинаковы.

Интенсивность рассеянных рентгеновских лучей зависит от ориентации образца относительно падающего и рассеянного лучей. С математической и, как мы вскоре увидим, с физической точек зрения удобно ввести новую переменную $\mathbf{S}$, называемую вектором рассеяния:

$$\mathbf{S} = (\hat{\mathbf{s}}/\lambda) - (\hat{\mathbf{s}}_0/\lambda) \quad (13.3)$$

Рис. 13.3, А показывает смысл этого вектора. Он направлен по биссектрисе угла, образованного направлениями падающего и рассеянного лучей. Размерность его обратна размерности длины, т.е. вектор $\mathbf{S}$ служит мерой числа периодов излучения, приходящихся на единицу длины (см). Длина вектора $\mathbf{S}$ зависит от угла рассеяния (рис. 13.3, Б):

$$\begin{aligned} \mathbf{S} \cdot \mathbf{S} &= (\hat{\mathbf{s}}^2 + \hat{\mathbf{s}}_0^2 - 2\hat{\mathbf{s}} \cdot \hat{\mathbf{s}}_0)/\lambda^2 = \\ &= 2(1 - \cos 2\theta)/\lambda^2 = (4 \sin^2 \theta)/\lambda^2 \end{aligned} \quad (13.4)$$

откуда длина вектора $\mathbf{S}$ равна

$$|\mathbf{S}| = 2|\sin \theta|/\lambda \quad (13.5)$$

Величина $|\mathbf{S}|$ может меняться от 0 до $2/\lambda$ (рис. 13.3, Б). Итак, вектор $\mathbf{S}$ определяется в системе координат, где каждая ось имеет размерность обратной длины. Эта система ко-

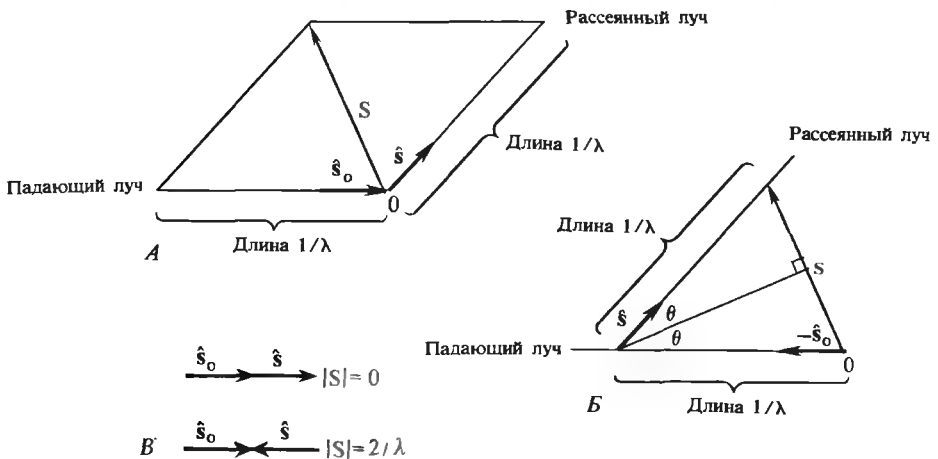


РИС. 13.3. Геометрия эксперимента по рассеянию рентгеновских лучей. Единичные векторы $\hat{\mathbf{s}}_0$ и $\hat{\mathbf{s}}$ определены на рис. 13.2, А. Вектор рассеяния $\mathbf{S}$ определен выражением (13.3). Б. Если единичный вектор $\hat{\mathbf{s}}$, соответствующий направлению рассеянного излучения, перенести на расстояние $1/\lambda$ вдоль оси $\hat{\mathbf{s}}_0$, он будет показывать прямо на конец вектора рассеяния $\mathbf{S}$. В. Расположения векторов $\hat{\mathbf{s}}_0$ и $\hat{\mathbf{s}}$, дающие минимальное и максимальное значения $|\mathbf{S}|$.

ординат задает так называемое обратное пространство. Как и в любом другом случае, координатные оси в пространстве, содержащем вектор $\mathbf{S}$, можно выбрать множеством различных способов. Далее мы придем к особенно удобному представлению, которое позволяет привязать вектор $\mathbf{S}$ к осям кристаллического образца.

РАССЕЯНИЕ КАК ФУНКЦИЯ ПОЛОЖЕНИЯ ЭЛЕКТРОНА

Волну $E(\mathbf{S})$, падающую на детектор (см. рис. 13.2, А) в результате рассеяния на одном электроном, находящемся в начале координат, можно рассчитать при квантовомеханическом рассмотрении взаимодействия рентгеновских фотонов с веществом¹⁾. Если в начале координат находится больше чем один электрон, то амплитуда излучения, рассеянного на данный угол, просто возрастает прямо пропорционально числу электронов.

В кристаллографии интересуются не столько рассеивающими свойствами отдельных электронов, сколько влиянием, оказываемым на картину рассеяния положением электрона. Поэтому мы можем поставить простой вопрос: как изменяется рассеяние при смещении электрона из начала координат? Определим структурный фактор $F(\mathbf{S})$ как отношение амплитуды волны, рассеянной реальным образцом, к соответствующей величине для образца, содержащего электрон в начале координат.

Предположим сначала, что наш образец — один электрон, но находится он не в начале координат, а в точке $\mathbf{r}$. Источник и детектор расположены очень далеко от электрона и велики по сравнению с $|\mathbf{r}|$. Поэтому с очень хорошей точностью угол рассеяния $\theta = (1/2)\arccos(\hat{\mathbf{S}} \cdot \hat{\mathbf{S}}_0)$ тот же, что и для электрона, помещенного в начале координат. Единственная разница в этих двух случаях — в длине пути, который проходят рентгеновские лучи от источника до образца и до детектора. Разность хода двух лучей равна просто $(\hat{\mathbf{S}}_0 - \hat{\mathbf{S}}) \cdot \mathbf{r}$ (рис. 13.2, В). При длине волны λ ей соответствует сдвиг на $(\hat{\mathbf{S}} - \hat{\mathbf{S}}_0) \cdot \mathbf{r} / \lambda = \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}$ периодов. Поэтому если волна, рассеянная электроном, находящимся в начале координат, есть $E(\mathbf{S})$, то смещение электрона в положение $\mathbf{r}$ приводит лишь к фазовому сдвигу, соответствующему $\mathbf{S} \cdot \mathbf{r}$ периодам. Таким образом, волна, рассеянная электроном, расположенным в точке $\mathbf{r}$, есть $E(\mathbf{S})e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}}$, а структурный фактор $F(\mathbf{S})$ соответственно равен $e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}}$.

В общем случае, поскольку электроны не локализованы, лучше рассматривать электронную плотность $\rho(\mathbf{r})$ в элементарном объеме $d\mathbf{r}$ с центром в точке $\mathbf{r}$; тогда рассеяние пропорционально $\rho(\mathbf{r})d\mathbf{r}$. В случае непрерывной электронной плотности в точке $\mathbf{r}$ структурный фактор есть

$$F(\mathbf{S}) = \rho(\mathbf{r})e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} d\mathbf{r} \quad (13.6)$$

где $\rho(\mathbf{r})d\mathbf{r}$ — число электронов в элементе объема $d\mathbf{r}$.

Для образца, состоящего из большого числа дискретных рассеивающих узлов, структурный фактор равен просто сумме большого числа членов в соответствии с уравнением (13.6). Для непрерывного электронного распределения сумма заменяется интегралом

$$F(\mathbf{S}) = \int d\mathbf{r} \rho(\mathbf{r})e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} \quad (13.7)$$

Интегрирование проводится по всему объему образца. Уравнение (13.7) — единственное основное уравнение, которое описывает полностью все рентгеновское рассеяние и дифракцию. Если известно распределение электронной плотности в образце $\rho(\mathbf{r})$, можно вычис-

¹⁾ Результат, изображенный на рис. 13.2, А, содержит одно серьезное упрощение. В действительности все рассеянные волны испытывают фазовый сдвиг, равный половине периода, по отношению к падающему излучению. Мы можем не обращать на это внимания, так как фазовый сдвиг одинаков для всех рассеянных волн.

лить структурный фактор и с его помощью найти ожидаемую картину рентгеновского рассеяния для любой геометрии эксперимента.

ОПИСАНИЕ РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ С ПОМОЩЬЮ ФУРЬЕ-ПРЕОБРАЗОВАНИЯ

Интеграл (13.7) по форме эквивалентен преобразованию Фурье, причем он обладает очень удобными свойствами (Дополнение 13.2). Отметим, что за пределами образца $\rho(\mathbf{r}) = 0$, поэтому интегрирование в (13.7) можно распространить на все пространство без изменения значения интеграла. Таким образом, физический смысл уравнения (13.7) состоит в том, что структурный фактор есть фурье-образ объекта.

Поскольку $F(\mathbf{S})$ есть фурье-образ $\rho(\mathbf{r})$, должен существовать второй интеграл Фурье, связывающий обе величины. Это обратное преобразование Фурье:

$$\rho(\mathbf{r}) = (1/V) \int d\mathbf{S} e^{-2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} F(\mathbf{S}) \quad (13.8)$$

Здесь интеграл берется по всему обратному пространству, V — постоянная, куда входят $(2\pi)^3$ и другие константы, которые компенсируют различия в единицах объема реального пространства $\mathbf{r}$ и обратного пространства $\mathbf{S}$. В дальнейшем мы иногда будем пренебрегать константой V .

Уравнение (13.8) означает, что если значения $F(\mathbf{S})$ измерены или вычислены во всем обратном пространстве, то можно просто рассчитать распределение электронной плотности в объекте. Таким образом, уравнения (13.7) и (13.8) образуют соотношение, позволяющее свободно переводить друг в друга структурные факторы и электронные плотности при условии, что они известны по всему пространству. В принципе это похоже на соотношение Кронига — Крамерса (см. гл. 8.), которое позволяет взаимнообращать данные КД и ДОВ.

Дополнение 13.2

СВОЙСТВА ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ФУРЬЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ФУНКЦИИ РЯДОМ ФУРЬЕ

Рассмотрим произвольную функцию $f(\theta)$, заданную на отрезке $-\pi \leq \theta \leq \pi$. Ее можно представить в виде суммы ряда функций с известными свойствами. Для подобного разложения пригодны лишь определенные системы функций, и на отрезке $[-\pi, \pi]$ такую систему образуют синусы и косинусы:

$$f(\theta) = \sum_{n=0}^{\infty} a_n \cos(n\theta) + a'_n \sin(n\theta)$$

где n принимает все целые положительные значения. Это разложение называется рядом Фурье. Коэффициенты a_n и a'_n — величины, зависящие от вида функции $f(\theta)$.

Как показано в Дополнении 13.1, синусы и косинусы можно представить в виде комплексных экспонент. Поэтому приведенный выше ряд Фурье можно переписать в виде

$$f(\theta) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} b_n e^{in\theta}$$

где индекс n пробегает как положительные, так и отрицательные значения, поскольку это необходимо для описания всех синусов и косинусов. Коэффициенты b_n можно найти простым способом, если воспользоваться следующим результатом.

Для любых двух целых чисел m и n имеем

$$\begin{aligned}\int_{-\pi}^{\pi} e^{in\theta} e^{-im\theta} d\theta &= \int_{-\pi}^{\pi} e^{i(n-m)\theta} d\theta = [1/i(n-m)](e^{i(n-m)\pi} - e^{-i(n-m)\pi}) = \\ &= [2/(n-m)] \sin(n-m)\pi = 0, \text{ если } n \neq m \\ &= 2\pi, \text{ если } n = m\end{aligned}$$

где результат для $n = m$ можно получить на основании предельного перехода $\lim_{x \rightarrow 0} \sin \pi x = \pi x$. Следовательно, чтобы найти определенное b_m , надо выполнить интегрирование:

$$(1/2\pi) \int_{-\pi}^{\pi} f(\theta) e^{-im\theta} d\theta = (1/2\pi) \int_{-\pi}^{\pi} d\theta \sum_{n=-\infty}^{\infty} b_n e^{in\theta} e^{-im\theta} = b_m$$

Отметим, что интегрирование ведется по всему отрезку, на котором определена функция $f(\theta)$. Часто оказывается удобным иметь дело не с отрезком $[-\pi, \pi]$, а с произвольной областью $[-L/2, L/2]$. В этом случае можно ввести новую переменную $x = L\theta/2\pi$, так что при $\theta = \pi$ имеем $x = L/2$, а при $\theta = -\pi$ $x = -L/2$. Подставляя эту переменную в написанные выше выражения и учитывая, что $dx = (L/2\pi)d\theta$, получаем

$$\begin{aligned}f(x) &= \sum_{n=-\infty}^{\infty} b_n e^{2\pi i n x / L} \\ b_n &= (1/L) \int_{-L/2}^{L/2} e^{-2\pi i n x / L} f(x) dx\end{aligned}$$

ПРЕОБРАЗОВАНИЕ ФУРЬЕ В ОДНОМЕРНОМ СЛУЧАЕ

Функция $f(x)$ определяется при всех значениях x , тогда как система коэффициентов b_n представляет собой бесконечный набор чисел, который должен быть затабулирован. Поэтому удобнее найти аналог ряда Фурье, в котором коэффициенты b_n были бы заменены некой функцией, а суммирование заменилось бы интегрированием. Такое представление называется преобразованием Фурье, когда область определения функции простирается от $-\infty$ до $+\infty$.

Определим новую непрерывную переменную $S = 2\pi n/L$ и новую непрерывную функцию $g(S) = L b_n$. Используя их, можно преобразовать выражение для b_n к виду

$$g(S) = \int_{-\infty}^{\infty} e^{-2\pi i S x} f(x) dx \quad (\text{А})$$

в пределе при $L \rightarrow \infty$. Тогда разложение $f(x)$ запишется следующим образом:

$$f(x) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} [g(S)/L] e^{2\pi i S x}$$

Прежде чем заменять сумму интегралом, заметим, что по определению S интервалу ΔS соответствует величина $(2\pi/L)\Delta n$. Но при суммировании $\Delta n = 1$, так что приращение dS в интеграле эквивалентно величине $2\pi/L$ в сумме. Таким образом,

$$f(x) = (L/2\pi) \int_{-\infty}^{\infty} [g(S)/L] e^{2\pi i S x} dS = (1/2\pi) \int_{-\infty}^{\infty} g(S) e^{2\pi i S x} dS \quad (\text{Б})$$

Выражения А и Б описывают пару фурье-образов, или фурье-трансформант, которые позволяют вычислить $f(x)$, если известно $g(S)$, и наоборот. Они особенно интересны тем, что x и S имеют взаимнообратные размерности. Например, если x — расстояние, то S — обратное расстояние. Вместо коэффициента $(1/2\pi)$ в выражении Б часто в обоих выражениях А и Б пишут перед интегралами $(1/\sqrt{2\pi})$.

ПРЕОБРАЗОВАНИЕ ФУРЬЕ В ТРЕХМЕРНОМ СЛУЧАЕ

Предположим теперь, что функция f определена в декартовой системе координат с осями x, y и z . При фиксированных y и z функцию $f(x, y, z)$ можно разложить в ряд Фурье по экспонентам $e^{2\pi i S_x x}$,

и ее Фурье-трансформантой будет (по аналогии с выражением А)

$$g_{yz}(S_x) = \int_{-\infty}^{\infty} e^{-2\pi i S_x x} f(x, y, z) dx$$

Это выражение в свою очередь можно разложить по экспонентам $e^{2\pi i S_y y}$ при фиксированном z и, наконец, по экспонентам $e^{2\pi i S_z z}$. В результате получим трехмерный фурье-образ вида

$$g(S_x, S_y, S_z) = \int_{-\infty}^{\infty} dz e^{-2\pi i S_z z} \int_{-\infty}^{\infty} dy e^{-2\pi i S_y y} \int_{-\infty}^{\infty} dx e^{-2\pi i S_x x} f(x, y, z)$$

Если S_x, S_y и S_z — компоненты вектора $\mathbf{S}$, а x, y, z — компоненты вектора $\mathbf{r}$, то трехмерное преобразование Фурье записывается очень компактно:

$$g(\mathbf{S}) = \int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{r} e^{-2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} f(\mathbf{r})$$

Подобно этому аналог выражения Б будет иметь вид

$$f(\mathbf{r}) = (1/2\pi)^3 \int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{S} e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} g(\mathbf{S})$$

ПРИМЕР СВОЙСТВ ФУРЬЕ-ПРЕОБРАЗОВАНИЯ

Для иллюстрации свойств уравнений (13.7) и (13.8) выведем второе уравнение из первого. Запишем интеграл $I(\mathbf{r}') = \int F(\mathbf{S}) e^{-2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}'} d\mathbf{S}$ в некоторой новой системе координат $\mathbf{r}'$. Подставив $F(\mathbf{S})$ из (13.7), находим

$$I(\mathbf{r}') = \int d\mathbf{S} e^{-2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}'} \int d\mathbf{r} \rho(\mathbf{r}) e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} \quad (13.9)$$

Изменив порядок интегрирования, получим

$$I(\mathbf{r}') = \int d\mathbf{r} \rho(\mathbf{r}) \int d\mathbf{S} e^{-2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}'} e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} = \int d\mathbf{r} \rho(\mathbf{r}) \int d\mathbf{S} e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot (\mathbf{r} - \mathbf{r}')} \quad (13.10)$$

Интеграл по $d\mathbf{S}$ в правой части выражения (13.10) обладает одним очень необычным свойством. Как явствует из дополнения 13.3 — это не что иное, как δ -функция Дирака:

$$\delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}') = \int d\mathbf{S} e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot (\mathbf{r} - \mathbf{r}')} \quad (13.11)$$

Дополнение 13.3

ДЕЛЬТА-ФУНКЦИЯ ДИРАКА

Покажем, что приведенный ниже интеграл является представлением одномерной дельта-функции Дирака:

$$\delta(x - x') = \int_{-\infty}^{\infty} e^{2\pi i (x - x') S} dS$$

Полученный результат легко обобщается на случай трех измерений. Если это дельта-функция, она должна подчиняться следующим трем условиям.

Во-первых, если $x' = x$, то $\delta(x - x') = \infty$. Очевидно, что это условие выполняется, ибо все экспоненты в интеграле при $x = x'$ равны единице, следовательно, интеграл бесконечен.

Во-вторых, при $x \neq x'$ $\delta(x - x') = 0$. То, что интеграл подчиняется и этому требованию, не столь очевидно. Показать это можно, если учесть, что комплексная экспонента — периодическая функция, непрерывно осциллирующая по всему пространству от -1 до 1 . С каждым положительным «всплеском» этой функции соседствует точно такой же отрицательный «всплеск». Площади под ними взаимно уничтожаются, так что при $x \neq x'$ интервал действительно обращается в нуль.

В-третьих, если $b < x' < a$, то

$$\int_b^a dx \delta(x - x') = 1$$

Пусть $a = x' + \varepsilon$, $b = x' - \varepsilon$. Тогда площадь под дельта-функцией равна

$$\begin{aligned} \int_{x'-\varepsilon}^{x'+\varepsilon} dx \int_{-\infty}^{\infty} e^{2\pi i(x-x')S} dS &= \int_{-\infty}^{\infty} dS \int_{x'-\varepsilon}^{x'+\varepsilon} dx e^{2\pi i(x-x')S} \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} e^{-2\pi i x' S} dS \int_{x'-\varepsilon}^{x'+\varepsilon} e^{2\pi i x S} dx \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} e^{-2\pi i x' S} [(1/2\pi i S)(e^{2\pi i(x'+\varepsilon)S} - e^{2\pi i(x'-\varepsilon)S})] dS \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} e^{-2\pi i x' S} [(e^{2\pi i x' S}/2\pi i S) 2i \sin 2\pi \varepsilon S] dS \\ &= (1/\pi) \int_{-\infty}^{\infty} [(\sin 2\pi \varepsilon S)/S] dS = 1, \quad \text{поскольку} \\ \int_0^x [(\sin x)/x] dx &= \int_{-\infty}^0 [(\sin x)/x] dx = \pi/2 \end{aligned}$$

Если x' не лежит между a и b , интеграл $\int_a^b \delta(x - x') dx$ равен нулю, так как функция везде равна нулю. Таким образом, мы видим, что первоначальный интеграл удовлетворяет всем требованиям и действительно есть дельта-функция Дирака.

Самое важное свойство дельта-функции — способность изменять область определения другой функции, т.е.

$$\int_{-\infty}^{\infty} dx f(x) \delta(x - x') = f(x')$$

Мы можем показать это, выбирая малый интервал $(x' - \varepsilon, x' + \varepsilon)$ около точки x' и разбивая весь интеграл на три части:

$$\int_{-\infty}^{x'-\varepsilon} dx f(x) \delta(x - x') + \int_{x'-\varepsilon}^{x'+\varepsilon} dx f(x) \delta(x - x') + \int_{x'+\varepsilon}^{\infty} dx f(x) \delta(x - x')$$

Первый и третий интегралы равны нулю для любой конечной функции $f(x)$, поскольку $\delta(x - x') = 0$ при $x \neq x'$. Второй интеграл можно оценить, если выбрать ε настолько малым, что $f(x) = f(x')$; тогда этот интеграл равен

$$f(x') \int_{x'-\varepsilon}^{x'+\varepsilon} dx \delta(x - x') = f(x')$$

Для этой функции характерно следующее. Если $r \neq r'$, то $\delta(r - r') = 0$. Если $r = r'$, то $\delta(r - r') = \infty$. Однако $\int \delta(r - r') dr = 1$ и [для некоторой произвольной функции $g(r)$] $\int g(r) \delta(r - r') dr = g(r')$, если точка $r = r'$ попадает в область интегрирования. Таким образом, $\delta(r - r')$ просто *вырезает* значение функции $g(r)$ при $r = r'$. Уравнение (13.10) принимает вид $I(r') = \rho(r')$. Учитывая, что g и r' — эквивалентные переменные, мы видим, что найденный результат совпадает с выражением (13.8) с точностью до константы V .

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРНОГО ФАКТОРА

К сожалению, в рентгеноструктурном анализе не существует способа прямого измерения $F(\mathbf{S})$. F — комплексная величина, которую можно записать в виде произведения двух сомножителей

$$F = |F|e^{i\phi} \quad (13.12)$$

или в виде суммы действительной и мнимой частей

$$F = F_r + iF_i. \quad (13.13)$$

Величина $|F|$ называется амплитудой структурного фактора или структурной амплитудой, а ϕ — фазой. Рис. 13.4 показывает¹⁾ как связаны между собой эти два представления $F(\mathbf{S})$:

$$F_r = |F| \cos \phi; \quad F_i = |F| \sin \phi \quad (13.14)$$

$$|F| = (F_r^2 + F_i^2)^{1/2}; \quad \phi = \arctg (F_i/F_r) \quad (13.15)$$

На опыте можно измерять лишь интенсивность излучения, рассеянного на угол 2θ . Если выразить отношение этой интенсивности к интенсивности излучения, рассеянного одним электроном в начале координат, то получим интенсивность дифракции

$$I(\mathbf{S}) = F(\mathbf{S})F^*(\mathbf{S}) = |F|^2 \quad (13.16)$$

Так как F — величина комплексная, то следует умножать на комплексно сопряженную величину, а не просто на $F(\mathbf{S})$. Интенсивность можно определить экспериментально, и она должна быть величиной действительной. Она равна квадрату модуля структурного фактора, или квадрату структурной амплитуды, так что $|F|$ можно измерять на опыте. Фазовый множитель $e^{i\phi}$ функции $F(\mathbf{S})$ прямо измерить нельзя; это главная трудность при рентгеноструктурном анализе. Чтобы воспользоваться уравнением (13.8) для вычисления $\rho(\mathbf{r})$, необходимо прежде рассчитать, угадать или оценить каким-то косвенным способом величину $e^{i\phi}$.

Электронная плотность в уравнениях (13.7) и (13.8) в принципе поддается непосредственному измерению, и поэтому она должна быть действительной. Как показано в опытах по рентгеновскому рассеянию, $\rho(\mathbf{r})$ ведет себя как действительная величина до тех пор, пока не наблюдается аномального рассеяния (vide infra). Действительность функции $\rho(\mathbf{r})$ позволяет вывести некоторые ограничения, налагаемые на $F(\mathbf{S})$. Поскольку $\rho(\mathbf{r})$ — действительная величина, $\rho(\mathbf{r}) = \rho^*(\mathbf{r})$. Подставляя уравнение (13.13) в (13.8) и беря комплекс-

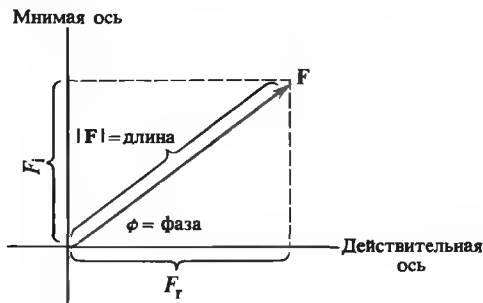


РИС. 13.4. Структурный фактор, представленный в виде вектора на комплексной плоскости.

¹⁾ Рис. 13.4 показывает, насколько удобно представление структурных факторов в виде векторов. В дальнейшем с ними часто оперируют как с векторами, хотя при этом и не используется принятое для векторов обозначение. — Прим.перев.

но сопряженную величину, получим

$$\int [F_r(\mathbf{S}) + iF_i(\mathbf{S})]e^{-2\pi i\mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} d\mathbf{S} = \int [F_r(\mathbf{S}) - iF_i(\mathbf{S})]e^{+2\pi i\mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} d\mathbf{S} \quad (13.17a)$$

Отметим, что $\mathbf{r}$ может принимать любое значение. Для того чтобы уравнение (13.17a) выполнялось при любом $\mathbf{r}$, необходимо, чтобы (для каждого значения $\mathbf{S}$) были справедливы соотношения

$$F_r(\mathbf{S}) = F_r(-\mathbf{S}) \quad \text{и} \quad F_i(\mathbf{S}) = -F_i(-\mathbf{S}) \quad (13.17b)$$

Иначе говоря, действительная часть функции рассеяния должна быть симметричной относительно начала координат в обратном пространстве, тогда как мнимая ее часть должна быть антисимметричной. Если это условие выполняется, функция $F(\mathbf{S})$ называется самосопряженной функцией.

Если результаты (13.17b) подставить в определение интенсивности, получается интересный вывод:

$$I(\mathbf{S}) = |F(\mathbf{S})|^2 = F_r^2 + F_i^2 = |F(-\mathbf{S})|^2 = I(-\mathbf{S}) \quad (13.18)$$

Из этого уравнения следует, что наблюдаемое распределение интенсивности дифракции (интенсивности рассеяния) симметрично относительно начала координат ($\mathbf{S} = 0$) в обратном пространстве. Этот результат, т.е. то, что $I(\mathbf{S})$ обладает центром симметрии в обратном пространстве, носит название закона Фриделя. Из него следует, что для получения всей информации, содержащейся в картине рассеяния, надо измерить только половину всех значений интенсивности рассеяния.

ТРЕБОВАНИЕ НЕОДНОРОДНОСТИ ЭЛЕКТРОННОЙ ПЛОТНОСТИ

Предположим, что распределение электронной плотности в нашем образце однородно, т.е. электронная плотность постоянна: $\rho(\mathbf{r}) = \rho$. Тогда структурный фактор равен

$$F(\mathbf{S}) = \rho \int d\mathbf{r} e^{2\pi i\mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} \quad (13.19)$$

Но это есть не что иное, как дельта-функция Дирака $\delta(\mathbf{S} - 0)$, так что из образца излучается только $F(0)$. Как видно из рис. 13.3, значению $\mathbf{S} = 0$ соответствует излучение, рассеянное в направлении падающего пучка. Другими словами, однородный образец вообще не способен отклонять рентгеновские лучи — точно так же, как среда с постоянным показателем преломления не может отклонять или фокусировать коллимированный световой пучок.

Основной принцип рассеяния состоит в требовании пространственной (или временной) неоднородности. Рассеяние обуславливается контрастом между данной областью и соседними областями¹⁾. Теперь следует рассчитать рассеяние от отдельных атомов, а затем от совокупностей атомов, образующих молекулы или кристаллические решетки.

РАССЕЯНИЕ ОТ ОТДЕЛЬНОГО АТОМА, НАХОДЯЩЕГОСЯ В НАЧАЛЕ КООРДИНАТ

Пусть образец состоит только из одного атома, расположенного в начале координат. Детали распределения электронной плотности отдельного атома зависят от того, в каких химических связях он участвует. Однако почти во всех рентгеноструктурных экспериментах разрешение не столь высоко, чтобы можно было различить детали такой картины. Поэтому в хорошем приближении можно считать распределение электронов в атоме сфе-

¹⁾ Определение контраста приводится в гл. 14. — *Прим. перев.*

рически симметричным. В таком случае $\rho(\mathbf{r})$ превращается в $\rho(r)$. Если переписать выражение (13.7) в сферических координатах, получим (рис. 13.5, А)

$$\begin{aligned} F(\mathbf{S}) &= \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^\pi \sin \theta d\theta \int_0^\infty dr \rho(r) r^2 e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} = \\ &= 2\pi \int_0^\infty dr \rho(r) r^2 \int_0^\pi d\theta \sin \theta e^{2\pi i S r \cos \theta} \end{aligned} \quad (13.20)$$

где S и r — соответственно модули векторов $\mathbf{S}$ и $\mathbf{r}$. Вводя замену $x = \cos \theta$ и вычисляя интеграл по θ , имеем

$$F(\mathbf{S}) = 4\pi \int_0^\infty dr \rho(r) r^2 [(\sin 2\pi S r) / 2\pi S r] = f(S) \quad (13.21)$$

Функция $f(S)$ называется атомным фактором рассеяния или атомным рассеивающим фактором. Она зависит только от $|\mathbf{S}|$ и, следовательно, согласно (13.5), только от угла между $\hat{\mathbf{S}}_0$ и $\hat{\mathbf{S}}$, но не зависит от ориентации образца. Заметим, что, поскольку $\rho(r) = \rho(-r)$, функция $f(S)$ действительна. Таким образом, интенсивность, измеренную в эксперименте по рассеянию на отдельном атоме, можно прямо использовать для вычисления $f(S)$ при помощи выражения (13.16):

$$f(S) = \pm [I(S)]^{1/2} \quad (13.22)$$

Единственная неоднозначность здесь — выбор знака; мы можем произвольно считать знак положительным.

В случае реального атома $\rho(r)$ можно аппроксимировать гауссовым распределением $\rho(r) = zNe^{-kr^2}$, где z — число электронов, N — нормировочный множитель, а k связана с шириной гауссовой кривой. Тогда интегрирование выражения (13.21) дает

$$f(S) = ze^{-(\pi^2/k)S^2} \quad (13.23)$$

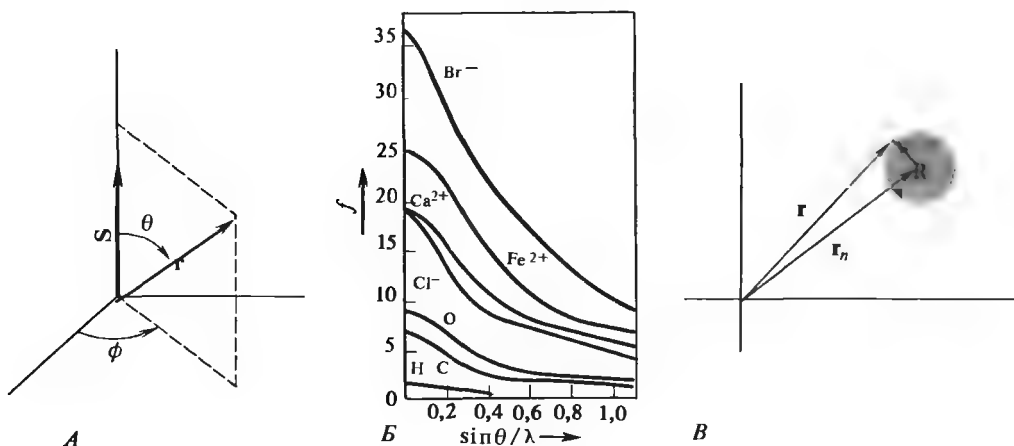


РИС. 13.5. Рассеяние рентгеновских лучей атомами. А. Система координат, используемая при выводе соотношения (13.20). Б. Зависимость атомного фактора рассеяния для различных атомов от угла рассеяния 2θ . (Glusker J.P., Trueblood K.N. Crystal Structure Analysis: A Primer, London, Oxford Univ. Press, 1972.) В. Система координат для описания атома, расположенного не в начале координат.

Это соотношение показывает, что знак атомного рассеивающего фактора одинаков по всему пространству. Для излучения, рассеянного в направлении падающего пучка ($S = 0$), атомный рассеивающий фактор просто равен числу электронов. Из выражения (13.23) следует, что сферические атомы рассеивают главным образом вперед. С увеличением угла рассеяния рассеивающий фактор довольно быстро убывает (рис. 13.5, Б).

РАССЕЯНИЕ ПРОИЗВОЛЬНО РАСПОЛОЖЕННЫМИ АТОМАМИ

Рассмотрим отдельный сферический атом с центром в точке $\mathbf{r}_n$. Как и прежде, $\mathbf{r}$ — вектор, связывающий начало координат с точкой внутри электронного облака атома, $\mathbf{R}$ — вектор, соединяющий центр атома с точкой $\mathbf{r}$, так что $\mathbf{r} = \mathbf{R} + \mathbf{r}_n$ (рис. 13.5, В). Из уравнения (13.7) имеем

$$F(\mathbf{S}) = \int d(\mathbf{R} + \mathbf{r}_n) \rho(\mathbf{R} + \mathbf{r}_n) e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot (\mathbf{R} + \mathbf{r}_n)} \quad (13.24)$$

Поскольку $\mathbf{r}_n$ — постоянный вектор, $d(\mathbf{R} + \mathbf{r}_n) = d\mathbf{R}$, а член $e^{2\pi i \mathbf{r}_n \cdot \mathbf{S}}$ можно вынести из-под знака интеграла:

$$F(\mathbf{S}) = e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}_n} \int d\mathbf{R} \rho(\mathbf{R} + \mathbf{r}_n) e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{R}} \quad (13.25)$$

Здесь интегрирование проводится по всему пространству. Так как ρ есть распределение электронной плотности в атоме, то добавление постоянного вектора $\mathbf{r}_n$, связывающего центр атома с началом координат, ничего не меняет. Таким образом, интеграл (13.25) идентичен интегралу (13.20) и совпадает с атомным рассеивающим фактором, так что в результате имеем

$$F(\mathbf{S}) = f(\mathbf{S}) e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}_n} \quad (13.26)$$

Для набора из N атомов, каждый из которых расположен в точке $\mathbf{r}_n$ и имеет атомный рассеивающий фактор f_n , суммарный структурный фактор будет равен

$$F(\mathbf{S}) = \sum_{n=1}^N f_n(\mathbf{S}) e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}_n} \quad (13.27)$$

где f_n — рассеивающий фактор n -го атома. Если N атомов образуют молекулу, то выражение (13.27) называется молекулярным структурным фактором $F_m(\mathbf{S})$.

Рассмотрим образец с центром симметрии. Если этот центр расположен в начале координат, то для каждого атома в точке $\mathbf{r}_n$, вносящего в (13.27) вклад $f_n(\mathbf{S}) e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}_n}$, имеется эквивалентный атом в точке $-\mathbf{r}_n$, вносящий вклад $f_n(\mathbf{S}) e^{-2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}_n}$. Поскольку $e^{\pm i x} = \cos x \pm i \sin x$ (см. Дополнение 13.1), то структурный фактор всего образца можно записать как centrosymmetричную функцию

$$F_{\text{цс}}(\mathbf{S}) = \sum_{n=1}^{N/2} 2f_n(\mathbf{S}) \cos(2\pi \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}_n) \quad (13.28)$$

которая является суммой по $N/2$ парам атомов, связанных отношением центральной симметрии. Эта функция действительна, и поэтому задача определения фазы $F_{\text{цс}}(\mathbf{S})$ значительно упрощается. Заметим (см. рис. 13.4), что ϕ должно равняться либо 0, либо π . Таким образом, член $e^{i\phi}$ должен быть просто $+1$ или -1 в каждой точке $\mathbf{S}$.

13.2. Дифракция рентгеновских лучей

ИНТЕРФЕРЕНЦИОННЫЕ ПОЛОСЫ ОТ НАБОРОВ АТОМОВ

В общем случае перемещение атомов из начала координат в точку $\mathbf{r}_n$ приводит к сдвигу фазы на величину $2\pi \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}_n$. Заметим, что в случае единственного атома это не приводит к каким-либо наблюдаемым изменениям в рассеянии, так как интенсивность по-прежнему остается равной $I(\mathbf{S}) = f^2(\mathbf{S})$. Допустим, однако, что наш объект состоит из двух атомов, один из которых расположен в начале координат, а другой — в точке $\mathbf{r}_n$. В этом случае суммарный структурный

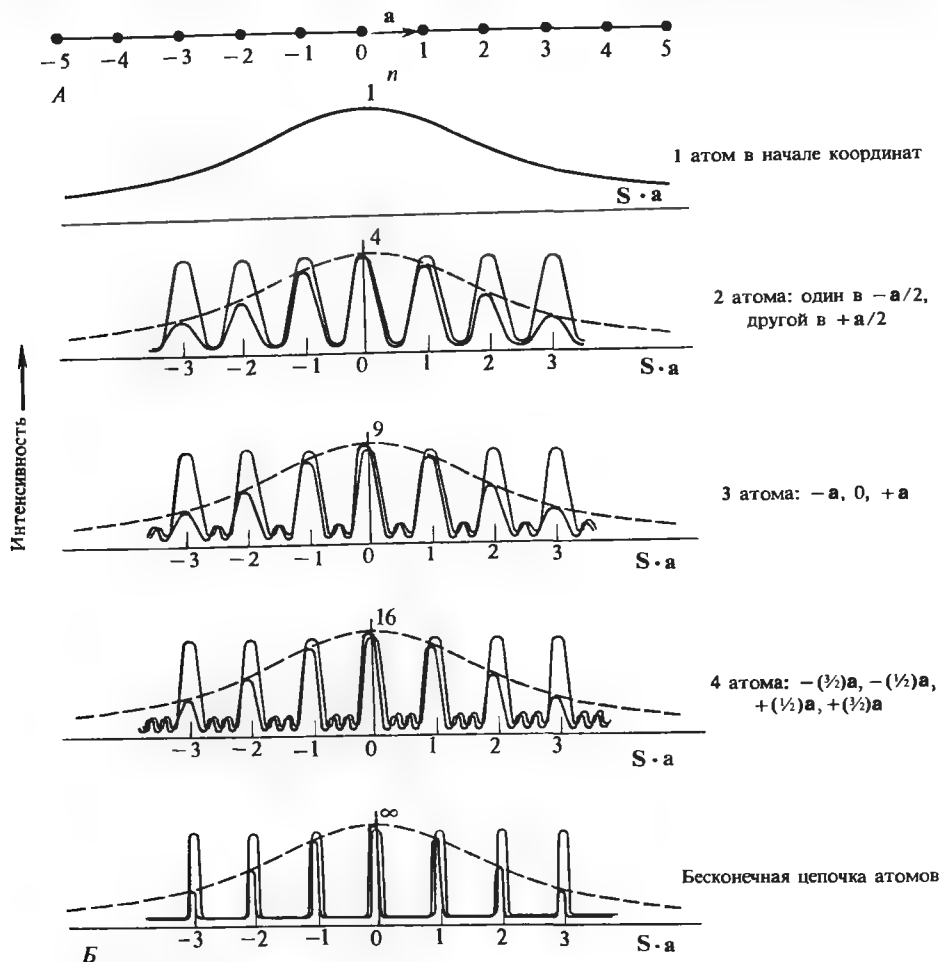
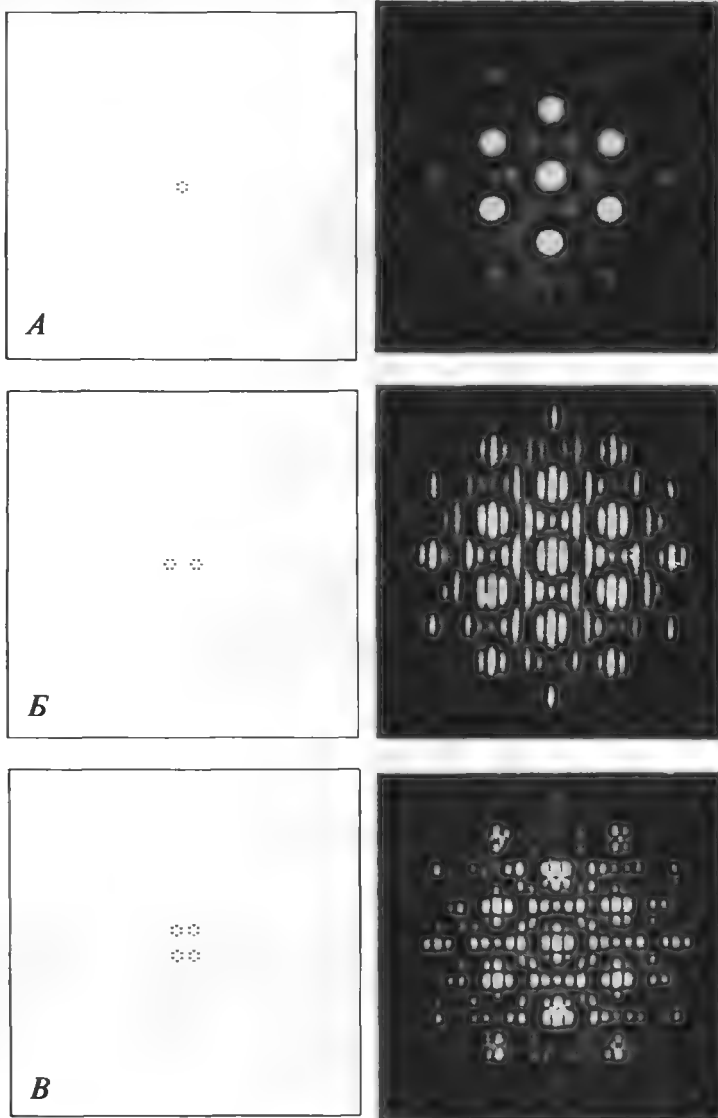


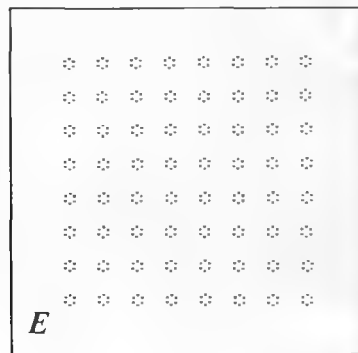
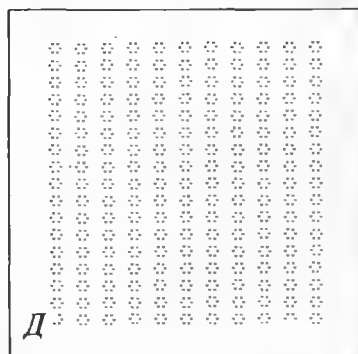
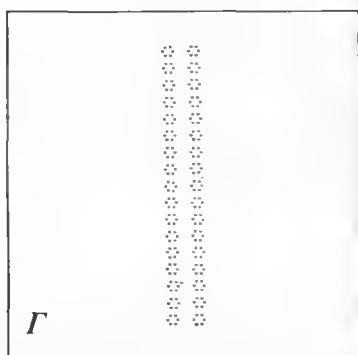
РИС. 13.6. Рассеяние рентгеновских лучей одномерным рядом атомов. А. Ряд атомов с вектором трансляции $\mathbf{a}$. Б. Интенсивность рассеяния как функция числа атомов в одномерной цепочке. Показаны действительно наблюдаемое рассеяние (черные кривые линии), рассеяние единственным атомом (пунктир) и интерференционная функция, обусловленная одномерной решеткой (коричневые кривые линии). Наблюдаемому рассеянию соответствует произведение интерференционной функции и рассеяния от одного атома. Следует обратить внимание на изменения масштаба вертикальной шкалы по мере увеличения числа атомов. Горизонтальная шкала дана в единицах $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a}$ и во всех случаях одинакова.

ОПТИЧЕСКАЯ ДИФРАКЦИЯ НА РЕШЕТКАХ

Рассмотренный в основном тексте математический формализм для расчета рентгеновской дифракции приложим и к оптической дифракции на системах щелей или точечных отверстий. На иллюстрациях показаны картины дифракции от серии непрозрачных масок с постепенно усложняющимся узором из точечных отверстий. Такие дифракционные картины можно получить при помощи метода, о котором шла речь в связи с рис. 10.4, когда в качестве объекта используется соответствующая маска. *Слева* везде изображены использованные в таких опытах маски, *справа* — отвечающие им дифракционные картины.



А. Шесть точечных отверстий, моделирующих шестиатомную молекулу. Б. Две шестиатомные молекулы, расположенные рядом. Обратите внимание на то, что наличие двух молекул приводит к появлению дополнительных вертикальных полос. В. Четыре шестиатомные молекулы. Вертикальная повторяемость структуры вызывает появление дополнительных горизонтальных полос. Г. Вертикальный ряд из множества пар шестиатомных молекул. Отметим, что пятна на дифракционной картине становятся более сжатыми в вертикальном направлении, но остаются широкими в горизонтальном направлении. Д. Двумерная кристаллическая решетка шестиатомных молекул. Теперь дифракционная картина представляет собой систему очень острых рефлексов. Е. Другая кристаллическая решетка тех же молекул. Увеличению размеров кристаллической решетки соответствует уменьшение размеров обратной решетки. (Harburn G., Taylor C. A., Welberry T. R. Atlas of Optical Transforms, Ithaca, N.Y., Cornell Univ. Press, 1975.)



фактор будет равен

$$F(S) = f(S)(1 + e^{2\pi i S \cdot r_n}) \quad (13.29a)$$

а для интенсивности рассеяния получим

$$I(S) = f^2(S)(1 + e^{2\pi i S \cdot r_n})(1 + e^{-2\pi i S \cdot r_n}) = 2f^2(S)[1 + \cos(2\pi S \cdot r_n)] \quad (13.29b)$$

Таким образом, помимо рассеяния от каждого атома в отдельности [множитель $f^2(S)$] имеется еще интерференция, описываемая членом $\cos(2\pi S \cdot r_n)$ (рис. 13.6, Б). Это можно сравнить с интерференционными полосами, наблюдаемыми в эксперименте по оптической дифракции на двух щелях (см. Дополнение 13.4). Произведение сомножителей в (13.29b), дополняющих $f^2(S)$ до полной интенсивности $I(S)$, часто называют интерференционной функцией.

Если бы можно было измерять рассеяние от объекта, состоящего всего из нескольких атомов, картина рентгеновских интерференционных полос давала бы информацию о пространственном расположении этих атомов. Но такие измерения невозможны, потому что интенсивность рассеяния от нескольких атомов чересчур мала. Число слагаемых в выражении для структурного фактора увеличивается с ростом суммарного числа атомов $N_{\text{сумм}}$ и поэтому наблюдаемая интенсивность растет как $N_{\text{сумм}}^2$. Для увеличения числа атомов без потери информации необходимо работать с периодическими цепочками атомов, такими, как кристаллы. Ниже мы рассмотрим картины интерференции, даваемые такими цепочками.

РАСЧЕТ РЕНТГЕНОВСКОЙ ДИФРАКЦИИ ОТ ОДНОМЕРНОЙ ЦЕПОЧКИ АТОМОВ

Начнем с одномерной цепочки, или ряда, состоящего из $2N + 1$ атомов. Центральный атом поместим в начало координат. Как показано на рис. 13.6, А, положение каждого атома в таком ряду получается путем трансляции соседнего атома на вектор $\mathbf{a}$. Положение n -го атома цепочки есть $n\mathbf{a}$. Структурный фактор для этого атома дается выражением (13.26):

$$F_n(S) = e^{2\pi i n S \cdot \mathbf{a}} f(S) \quad (13.30)$$

Таким образом, рассеяние от любого из атомов можно выразить через атомный фактор рассеяния $f(S)$ для атома в начале координат. Структурный фактор для всего ряда атомов можно записать в виде

$$F_{\text{сумм}}(S) = f(S) \sum_{n=-N}^N e^{2\pi i n S \cdot \mathbf{a}} \quad (13.31)$$

Сумма есть не что иное, как интерференционная функция для нашей цепочки.

Подобным же образом можно описать и линейную цепочку молекул. Если она порождена трансляцией, результирующее рассеяние опишется выражением, идентичным (13.31), с той лишь разницей, что атомный рассеивающий фактор $f(S)$ заменяется молекулярным структурным фактором $F_m(S)$. Однако в случае молекул могут получиться более сложные цепочки, если соседние молекулы будут связаны не только трансляциями, но и вращениями. Используемые здесь методы нетрудно распространить и на такие случаи; некоторые примеры приводятся в гл. 14, где обсуждается рассеяние от спиралей.

Сумма в выражении (13.31) есть просто сумма геометрической прогрессии с первым членом $e^{-2\pi i N S \cdot \mathbf{a}}$, знаменателем $e^{2\pi i S \cdot \mathbf{a}}$ и последним членом $e^{2\pi i N S \cdot \mathbf{a}}$. Эта сумма равна $t(1 - r^m)/(1 - r)$, где r — знаменатель прогрессии, m — число ее членов, а t — ее первый член. Используя это выражение, преобразуем (13.31) к виду

$$F_{\text{сумм}}(S) = f(S) \frac{e^{-2\pi i N S \cdot \mathbf{a}} (1 - e^{2\pi i (2N+1) S \cdot \mathbf{a}})}{1 - e^{2\pi i S \cdot \mathbf{a}}} \quad (13.32)$$

Упростим полученное выражение, умножая числитель и знаменатель на $e^{-\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{a}}$:

$$\begin{aligned} F_{\text{сумм}}(\mathbf{S}) &= f(\mathbf{S}) \frac{e^{-\pi i(2N+1)\mathbf{S} \cdot \mathbf{a}} - e^{\pi i(2N+1)\mathbf{S} \cdot \mathbf{a}}}{e^{-\pi \mathbf{S} \cdot \mathbf{a}} - e^{\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{a}}} = \\ &= f(\mathbf{S}) \frac{\sin[(2N+1)\pi \mathbf{S} \cdot \mathbf{a}]}{\sin(\pi \mathbf{S} \cdot \mathbf{a})} \end{aligned} \quad (13.33)$$

Чтобы получить окончательное выражение (13.33), мы воспользовались тем, что $e^{\pm ix} = \cos x \pm i \sin x$. Суммарная интенсивность рассеяния от цепочки атомов равна

$$I_{\text{сумм}}(\mathbf{S}) = |F_{\text{сумм}}(\mathbf{S})|^2 = [f(\mathbf{S})]^2 \left(\frac{\sin[(2N+1)\pi \mathbf{S} \cdot \mathbf{a}]}{\sin(\pi \mathbf{S} \cdot \mathbf{a})} \right)^2 \quad (13.34)$$

На рис. 13.6,Б схематически показана зависимость этой функции от размера (длины) цепочки атомов. Можно видеть, что по мере увеличения N интенсивность стремится к 0 всюду, за исключением тех точек, где $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a}$ — целое число. Множителем $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a}$ в (13.34) определяется относительная ориентация объекта и детектора. Отметим, что интенсивность рассеяния максимальна при $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = 0$. Это имеет место тогда, когда вектор $\mathbf{S}$ лежит в плоскости, перпендикулярной оси цепочки.

ДИСКРЕТНАЯ КАРТИНА ДИФРАКЦИИ ОТ ОДНОМЕРНОЙ ЦЕПОЧКИ

Полезно рассмотреть, как ведет себя выражение (13.33) при увеличении N . Для большинства значений $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a}$ значение $\sin(\pi \mathbf{S} \cdot \mathbf{a})$ лежит между 0,1 и 1,0 или между -0,1 и -1,0. При этом $\sin[(2N+1)\pi \mathbf{S} \cdot \mathbf{a}]$ сильно осциллирует между 0 и 1. Поэтому значения частного в правой части (13.33) попадают в область приблизительно между -10 и 10 независимо от N . Но что получается, когда $\sin(\pi \mathbf{S} \cdot \mathbf{a})$ приближается к 0? Легче всего проверить это, устремляя $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a}$ к нулю. Если воспользоваться разложением синуса в ряд: $\sin x = x - x^3/3! + \dots$ и оставить только первый член в этом разложении при $x \rightarrow 0$, то частное в (13.33) превратится в $(2N+1)(\pi \mathbf{S} \cdot \mathbf{a})/(\pi \mathbf{S} \cdot \mathbf{a}) = 2N+1$.

В кристаллической одномерной молекулярной решетке N может достигать 10^6 (или больше). Поэтому структурный фактор становится очень большим всякий раз, как только $\sin(\pi \mathbf{S} \cdot \mathbf{a})$ приближается к нулю. Это происходит во всех случаях, когда величина $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a}$ приближается к целому числу. По сравнению с острым пиком рассеяния при целом $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a}$ все остальные значения $F(\mathbf{S})$ пренебрежимо малы. Следовательно, интерференционная функция для линейной цепочки (ряда) точек (атомов) приводит к дискретной картине рассеяния. (В Дополнении 13.4 иллюстрируются подобные эффекты при оптической дифракции.) Вообще рассеяние может наблюдаться только для определенных относительных ориентаций объекта и детектора рентгеновских лучей. Этот результат носит название условия Лауэ:

$$\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = h, \quad \text{где } h = 0, \pm 1, \pm 2, \dots \quad (13.35)$$

Вектор $\mathbf{a}$ характеризует данную одномерную кристаллическую решетку и ее ориентацию в пространстве. Вектор $\mathbf{S}$ зависит от геометрии эксперимента. Наблюдаемое рассеяние зависит только от $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a}$ и интенсивно только при выполнении условия (13.35). Геометрический смысл этого иллюстрирует рис. 13.7. Величина $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a}$ есть проекция $\mathbf{S}$ на $\mathbf{a}$. Пусть $\mathbf{a}$ фиксирован. Тогда условие $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = 0$ означает, что $\mathbf{S}$ может быть любым вектором, перпендикулярным $\mathbf{a}$ и проходящим через начало координат (рис. 13.7,А). Усло-

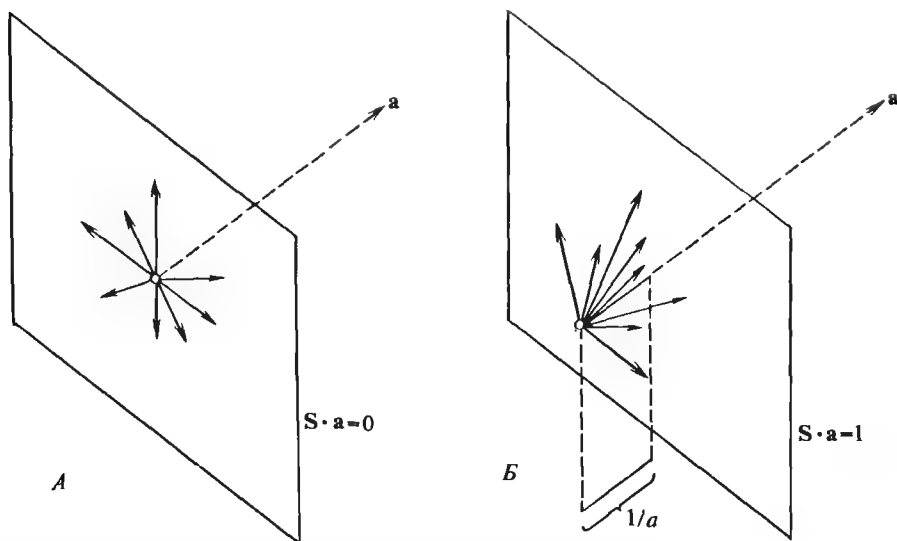


РИС. 13.7. Условия Лауэ для одномерной цепочки рассеивающих центров. Векторы рассеяния изображены сплошными линиями. А. Случай $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = 0$. Б. Случай $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = 1$.

вие $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = 1$ означает, что $\mathbf{S}$ может быть любым вектором, проведенным из начала координат в какую-либо точку на плоскости, перпендикулярной $\mathbf{a}$ и отстоящей на расстоянии $1/a$ от начала координат (рис. 13.7,Б). Например, если $\mathbf{S}$ параллельно $\mathbf{a}$, то условие $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = 1$ означает, что $|\mathbf{S}| = 1/|\mathbf{a}|$.

Если обобщить это рассмотрение, станет ясно, что целые значения $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a}$ определяют ряд параллельных плоскостей. Расстояние между этими плоскостями равно $1/a$ (рис. 13.8,А). Набор параллельных плоскостей в обратном пространстве определяет все те значения вектора рассеяния, для которых можно измерить интенсивность. Дальнейшие ограничения появляются, если постоянна длина волны падающего рентгеновского излучения и фиксировано его направление $\hat{\mathbf{S}}_0$.

Как только выбрано направление $\hat{\mathbf{S}}_0$, различные направления $\hat{\mathbf{S}}$, в которых наблюдается рассеяние, определяются строго ограниченным набором возможных векторов рассеяния $\mathbf{S}$. Из рис. 13.3,Б видно, что вектор $\mathbf{S}$, идущий из начала координат обратного пространства, всегда оканчивается в точке, лежащей на оси вектора $\hat{\mathbf{S}}$ и отстоящей от его начала на расстояние $1/\lambda$. Геометрическим местом точек, отстоящих от начала векторов $\hat{\mathbf{S}}$ на расстояние $1/\lambda$, будет сфера с радиусом $1/\lambda$ и центром в начале $\hat{\mathbf{S}}$. Таким образом, все возможные векторы рассеяния $\mathbf{S}$, начинающиеся в начале координат, должны достигать поверхности сферы радиуса $1/\lambda$ (рис. 13.8,Б). Эта сфера называется сферой отражения. Она всегда касательна к плоскости, проведенной через начало координат перпендикулярно направлению падающего пучка $\hat{\mathbf{S}}_0$.

Рассеяние рентгеновских лучей будет наблюдаться только в том случае, если одновременно выполняются условия Лауэ и условия, налагаемые сферой отражения. Это означает, что вектор рассеяния должен оканчиваться в точках пересечения сферы отражения с рядом параллельных плоскостей. Как показано на рис. 13.8,Б, это пересечение представляет собой ряд параллельных окружностей. Их ориентация и характеристика набора плоскостей, который их порождает, зависят только от угла между $\hat{\mathbf{S}}_0$ и $\mathbf{a}$.

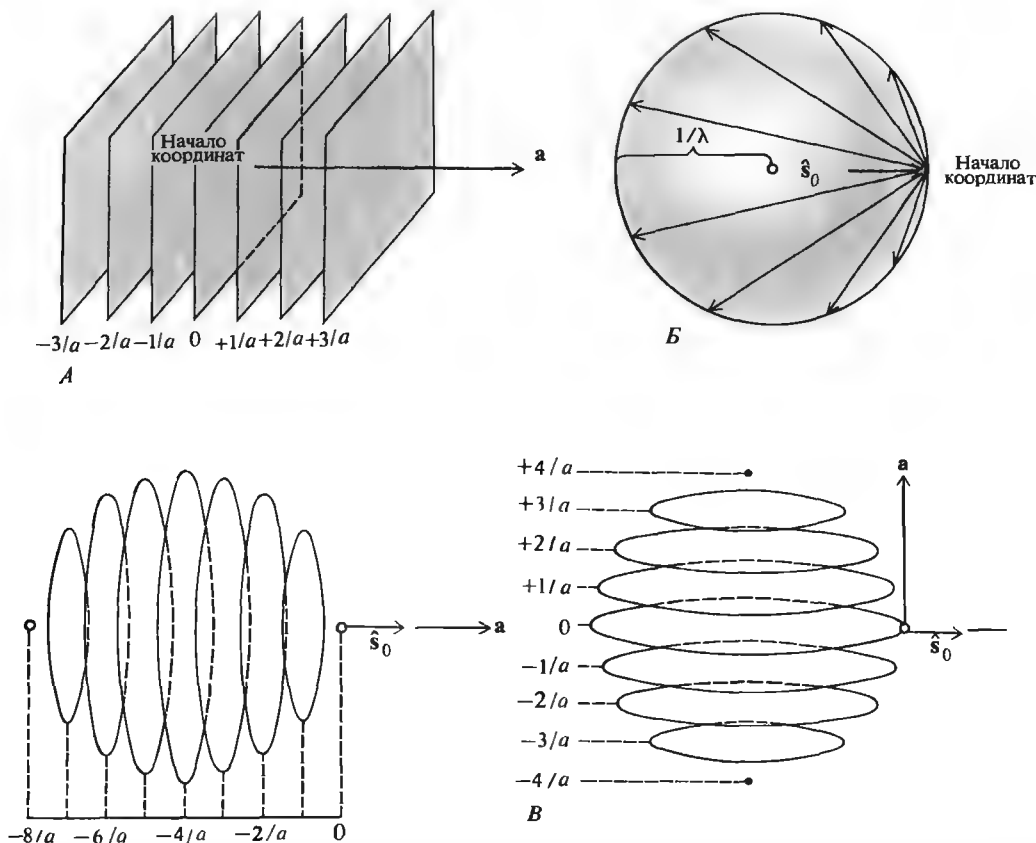


РИС. 13.8. Условия, при которых наблюдается рассеяние от одномерной цепочки атомов, показанной на рис. 13.6. А. Система параллельных плоскостей, представляющая условие Лауэ для цепочки атомов. Б. При фиксированном направлении падающего пучка $\hat{s}_0$ концы возможных векторов рассеяния должны лежать на поверхности сферы (см. также рис. 13.3., А). В. Объединение двух условий, проиллюстрированных на фрагментах рисунков А и Б, для двух различных взаимных ориентаций векторов $\mathbf{a}$ и $\hat{s}_0$.

РАССЕЯНИЕ ОТ ОТДЕЛЬНОГО АТОМА ИЛИ МОЛЕКУЛЫ, ВХОДЯЩИХ В СОСТАВ ПЕРИОДИЧЕСКОЙ ЦЕПОЧКИ

В случае объекта, состоящего из одного атома, атомный рассеивающий фактор $f(S)$ можно измерить при данной ориентации объекта и данном $\hat{s}_0$ в любой точке поверхности сферы радиуса $1/\lambda$. В случае линейной цепочки атомов, ориентированной вдоль вектора $\mathbf{a}$, этот атомный фурье-образ можно измерить только там, где сфера пересекается набором параллельных плоскостей, отстоящих друг от друга на расстояние $1/a$ (рис. 13.8, В). Можно говорить о том, что из атомного или молекулярного структурного фактора, представленного исходно широким распределением, вырезаются лишь отдельные «куски». Рис. 13.6 иллюстрирует еще один пример такого вырезания (см. также Дополнение 13.4). Ориентация рассеивающих плоскостей и расстояние между ними содержат всю информа-

цию о периодической цепочке точек (рассеивающих центров), но не содержат информации о самих рассеивающих центрах, т.е. атомах или молекулах. Она заключена в значении (амплитуде и фазе) структурного фактора в тех местах, где он вырезается.

Заметим, что все условия, ограничивающие наблюдения рассеяния, были представлены на рис. 13.7 и 13.8 с помощью вектора $\mathbf{S}$. Размерность $\mathbf{S}$ — обратная длине, и, следовательно, система координат, изображенная на этих рисунках, определяет обратное пространство. Увеличение расстояния между атомами периодической цепочки (в реальном пространстве) вызовет уменьшение в соответствии с условиями Лауэ расстояния между параллельными плоскостями (в обратном пространстве).

При заданной ориентации $\mathbf{a}$ и $\hat{\mathbf{S}}_0$ в любом данном эксперименте можно промерить лишь ограниченную область обратного пространства. Эту область можно расширить, изменяя угол между $\mathbf{a}$ и $\hat{\mathbf{S}}_0$, т.е. либо поворачивая образец, либо меняя направление падающего пучка рентгеновских лучей. Максимально возможное значение $|\mathbf{S}|$ составляет при любой геометрии $2/\lambda$ (см. рис. 13.3, В). Следовательно, максимально доступная для измерения область обратного пространства — при всех взаимных ориентациях $\mathbf{a}$ и $\hat{\mathbf{S}}_0$ — есть сфера с радиусом $2/\lambda$, центр которой находится в начале координат обратного пространства. Эта сфера называется сферой ограничения (см. ниже рис. 13.23, Б).

РЕНТГЕНОВСКОЕ РАССЕЯНИЕ, НАБЛЮДАЕМОЕ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

Вектор рассеяния $\mathbf{S}$ очень удобен с точки зрения математики, но что же происходит в реальном эксперименте? Рис. 13.9 иллюстрирует реально наблюдаемую дифракцию от линейной цепочки идентичных рассеивателей. Пусть образец помещен в точке, лежащей на оси цилиндра, образованного рентгеновской пленкой (рис. 13.9, А). Рентгеновские лучи падают на образец в заданном направлении, и вся интенсивность рассеянных лучей детектируется пленкой. Различным векторам рассеяния $\mathbf{S}$ теперь соответствуют различные углы рассеяния 2θ . Пусть каждый рассеиватель — это отдельный атом. Тогда, если образец состоит лишь из одного атома, находящегося в начале координат, рассеяние будет описываться выражением (13.23) (рис. 13.9, Б).

Наличие линейной цепочки атомов выразится в том, что некоторая конечная интенсивность будет наблюдаться лишь при таких углах рассеяния, которые соответствуют пересечению набора плоскостей ($\mathbf{a} \cdot \mathbf{S} = h$, $h = 0, \pm 1, \pm 2 \dots$) со сферой отражения. Каждому вектору рассеяния $\mathbf{S}$, проведенному в одну из точек пересечения, будет соответствовать свой луч рассеянного излучения. Согласно уравнению (13.3), этот луч распространяется в направлении $\hat{\mathbf{S}} = \lambda \mathbf{S} + \hat{\mathbf{S}}_0$ (рис. 13.3).

Для расчета картины, создаваемой рассеянным излучением, лучше всего воспользоваться схемой, приведенной на рис. 13.3, Б (а не эквивалентной ей, показанной на рис. 13.3, А). Начало вектора $\hat{\mathbf{S}}$ помещается на оси вектора $\hat{\mathbf{S}}_0$, в точке, находящейся на расстоянии $1/\lambda$ от начала координат. Другими словами, можно считать, что вектор $\hat{\mathbf{S}}$ исходит из центра сферы отражения. Изображенный таким образом вектор указывает на конец соответствующего вектора рассеяния $\mathbf{S}$ (рис. 13.3, Б и 13.9, Д).

Векторы $\mathbf{a}$ и $\hat{\mathbf{S}}_0$ фиксированы выбором ориентации образца и падающего пучка. Каждый вектор рассеяния $\mathbf{S}$ по условиям Лауэ начинается в начале координат и кончается на одной из плоскостей, отстоящих друг от друга на расстояние $1/a$. На рис. 13.9, Г и Д изображены два сечения обратного пространства, проходящие через начало координат. В плоскости, определяемой условием $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = 0$, разрешен непрерывный набор векторов рассеяния $\mathbf{S}$ во всех направлениях. Это приводит к непрерывному распределению интенсивности рассеянного излучения, которое расходится от образца по окружности, лежащей в плоскости, параллельной плоскости $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = 0$ (рис. 13.9, Е).

В плоскости, параллельной вектору $\mathbf{a}$, разрешены лишь определенные значения вектора $\mathbf{S}$. Так, векторы, соответствующие интенсивности рассеянного излучения, появляются лишь при определенных значениях угла отклонения α (рис. 13.9,Г). Простые геометрические соображения показывают, что $\sin \alpha = h\lambda/a$, где h — любое целое число, удовлетворяющее условию $|h| \leq a/\lambda$. Каждому значению h соответствует свой конус рассеяния (рис. 13.9,Е). Там, где этот конус пересекается с цилиндрической пленкой, возникает кольцообразное ее почернение. Если пленку развернуть, кольцо превратится в линию, называемую слоевой. Все слоевые линии параллельны друг другу, и расстояние между ними увеличивается с ростом $|h|$. Эти линии перпендикулярны линейной цепочке атомов (рис. 13.9,Ж).

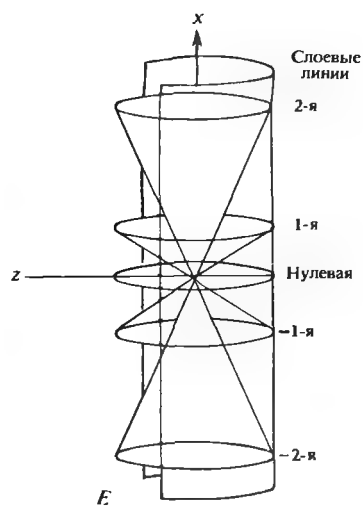
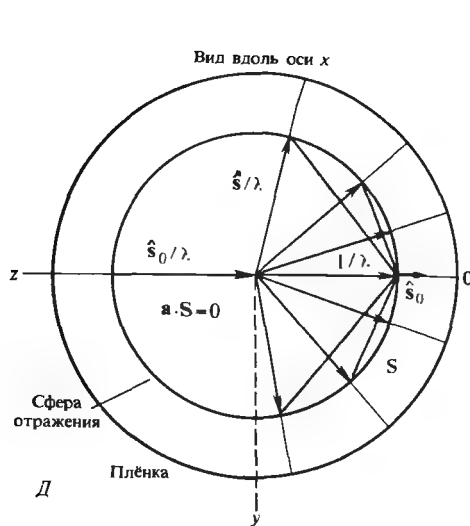
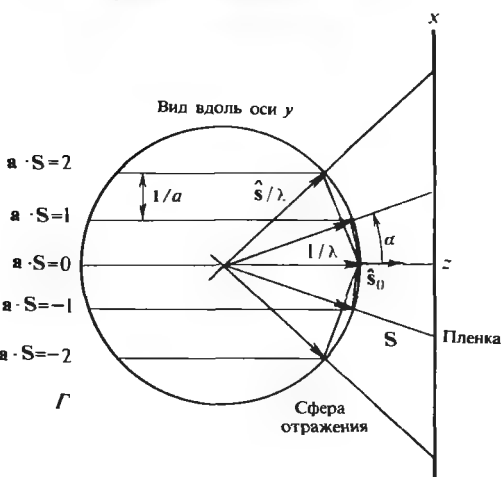
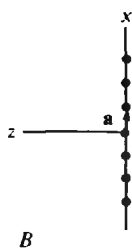
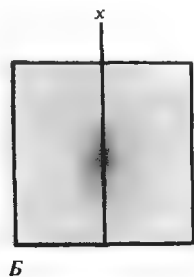
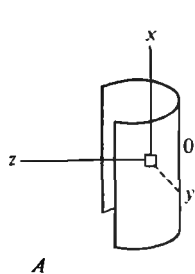
Рассеяние от отдельного атома (рис. 13.9,Б) регистрируется пленкой только на линиях, разрешенных для данной линейной цепочки атомов. Это приводит к тому, что картина рассеяния выглядит так, как показано на рис. 13.9,З. Отметим, что из-за ограничений, налагаемых сферой отражения, видно лишь ограниченное число слоевых линий. Максимальное значение $\sin \alpha$ равно единице. В случае геометрии, изображенной на рис. 13.9,В, это значение достигается, когда $\hat{\mathbf{S}}$ параллелен $\mathbf{a}$. Отсюда максимальное значение h , при котором соответствующая плоскость еще попадает в сферу отражения, равно $\pm |a|/\lambda$. Пусть, к примеру, $|a| = 5 \text{ \AA}$, $a\lambda = 1 \text{ \AA}$. Тогда h может принимать целые значения лишь между -5 и $+5$ ($-5 \leq h \leq +5$), и дифракционная картина содержит в этом случае 11 слоевых линий.

Рис. 13.9,З показывает, что интенсивность рассеяния уменьшается с ростом h . Это происходит потому, что атомное рассеяние убывает как e^{-S^2} . Из рис. 13.9,Г и Д видно, что большим значениям h соответствуют и большие значения $|\mathbf{S}|$. На каждой слоевой линии интенсивность также быстро спадает по мере удаления от центра слоевой линии к ее периферии. Это происходит из-за того, что удаление от центра слоевой линии неизбежно сопровождается увеличением длины вектора рассеяния $|\mathbf{S}|$ (рис. 13.9,Д).

Вид картины рассеяния существенным образом зависит от взаимной ориентации падающего пучка рентгеновских лучей ($\hat{\mathbf{S}}_0$) и периодического ряда точек ($\mathbf{a}$). Если, например, периодическую цепочку повернуть так, чтобы $\mathbf{a}$ и $\hat{\mathbf{S}}_0$ стали параллельны (рис. 13.9,И), то картина рассеяния из ряда линий превратится в систему концентрических кривых (рис. 13.9,Л). Эти кривые имеют вид эллипсов, поскольку линия пересечения конуса (рассеянные лучи) с цилиндрической поверхностью (пленка), ось которой перпендикулярна оси конуса, есть эллипс.

РЕНТГЕНОВСКОЕ РАССЕЯНИЕ ОТ ДВУМЕРНОЙ ПЕРИОДИЧЕСКОЙ АТОМНОЙ РЕШЕТКИ

Рис. 13.8 и 13.9 иллюстрируют основные идеи рентгеновских кристаллографических экспериментов. Однако для практического использования этих идей необходимо распространить их на случай трехмерного кристалла. Рассмотрим вначале двумерную молекулярную решетку (рис. 13.10,А). Ее периодичность определяется двумя векторами, $\mathbf{a}$ и $\mathbf{b}$. В общем случае эти векторы не перпендикулярны друг другу и имеют разную длину. Периодичность вдоль $\mathbf{a}$ даст ненулевую интенсивность рассеяния в плоскостях $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = h$ точно так же, как и в случае одномерной цепочки, показанной на рис. 13.8. Дополнительная периодичность вдоль $\mathbf{b}$ приводит к дополнительному условию, согласно которому рассеянная интенсивность должна также существовать в системе плоскостей $\mathbf{S} \cdot \mathbf{b} = k$, где k — любое целое число. С помощью рассуждений, аналогичных предыдущим, не-



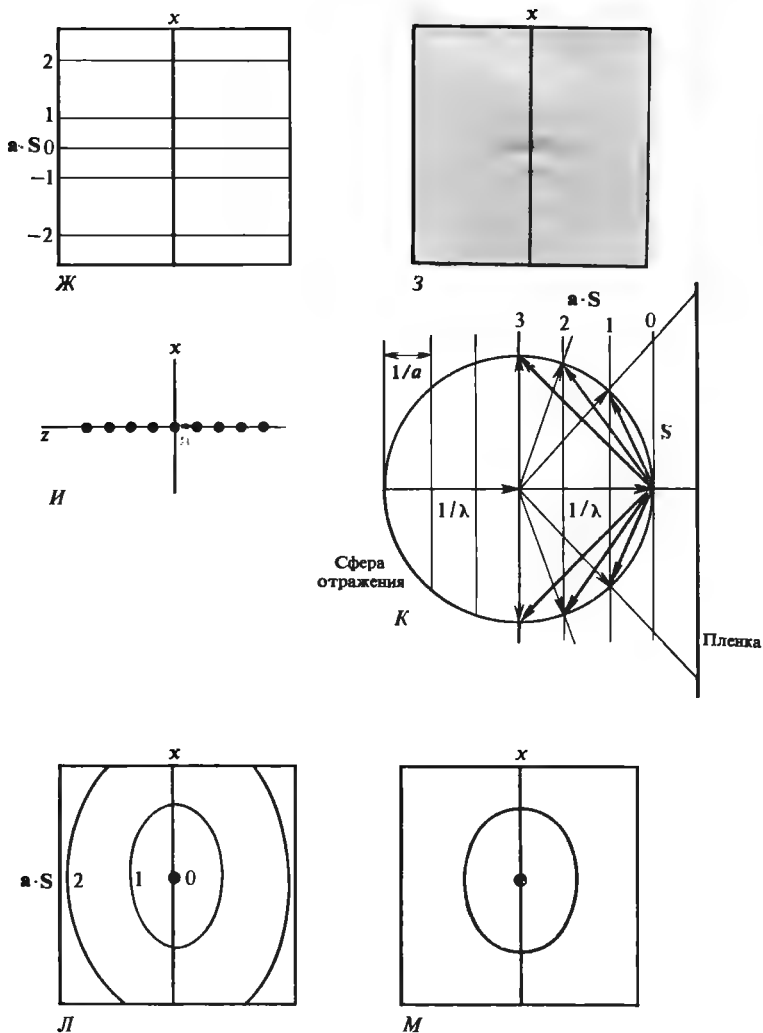


РИС. 13.9. Рентгеновское рассеяние от одномерной цепочки атомов, наблюдаемое в лабораторных условиях. *А*. Рентгеновские лучи, идущие в направлении z , падают на образец, помещенный в начале координат, а рассеянные лучи регистрируются цилиндрической пленкой. *Б*. Картина рассеяния от одного атома. Поскольку применяется цилиндрическая пленка, для картины рассеяния характерна эллиптическая симметрия; при использовании плоской пленки картина рассеяния обладала бы круговой симметрией. *В*. Линейный ряд точек (атомов). *Г*. Рассеянное излучение, разрешенное условиями Лауэ, в плоскости $x - z$. *Д*. Рассеянное излучение, разрешенное условиями Лауэ, в плоскости $y - z$. *Е*. Конусы рассеянного излучения, возникающие из-за условий Лауэ, для геометрии, представленной на фрагменте рисунка *А*. Все рассеянные лучи идут по поверхности одного из конусов. *Ж*. Картина дифракции от одномерного ряда точек, возникающая в результате пересечения конусов рассеянного излучения с цилиндрической пленкой. *З*. Рассеяние, наблюдаемое в действительности, является «произведением» атомного рассеяния (фрагмент *Б*) и картины дифракции, изображенной на фрагменте *Ж*. *И*. Иная геометрия рассеяния, когда ось одномерного ряда точек параллельна направлению падающего излучения. *К*. Рассеянные лучи, разрешенные условиями Лауэ, для геометрии, изображенной на фрагменте *И*. *Л*. Вид дифракционной картины для геометрии, показанной на фрагменте *И*. *М*. «Произведение» дифракционной картины на фрагменте *Л* и атомного рассеяния, показанного на фрагменте *Б*.

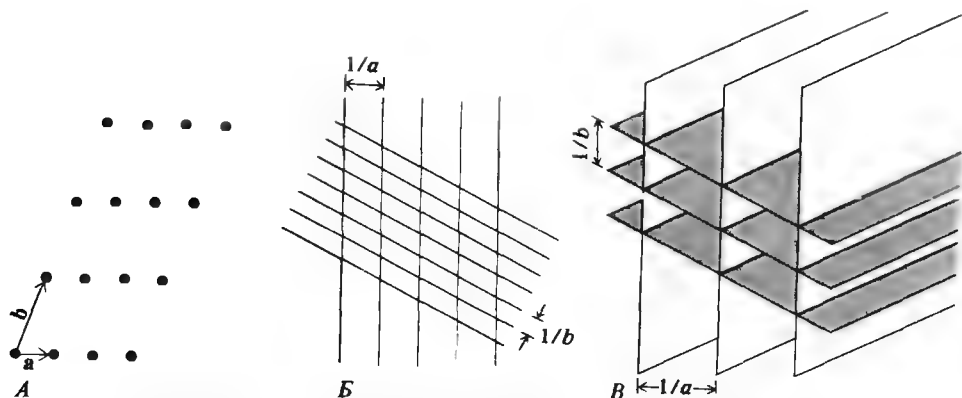


РИС. 13.10. Рентгеновское рассеяние от двумерной решетки рассеивающих центров. А. Двумерная решетка, определяемая векторами $\mathbf{a}$ и $\mathbf{b}$. Б. Параллельные плоскости, показанные в поперечном сечении, которые определяют возможные положения вектора рассеяния $\mathbf{S}$. Плоскости, перпендикулярные $\mathbf{a}$, отстоят друг от друга на $1/a$, плоскости, перпендикулярные $\mathbf{b}$, — на расстояние $1/b$. В. Система параллельных прямых, получающихся в результате пересечения двух наборов параллельных плоскостей, представленных на фрагменте Б. Векторы рассеяния, идущие из начала координат в любую точку одной из этих прямых, дадут наблюдаемое рентгеновское рассеяние.

трудно показать, что это дополнительный набор плоскостей, перпендикулярных вектору $\mathbf{b}$ и отстоящих друг от друга на расстояние $1/|\mathbf{b}|$ (рис. 13.10,Б).

Рассеянная интенсивность будет наблюдаться только там, где одновременно выполняются оба условия Лауэ: $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = h$ и $\mathbf{S} \cdot \mathbf{b} = k$. Но они удовлетворяются лишь для пересечения двух указанных наборов параллельных плоскостей. Такие пересечения образуют набор или семейство параллельных прямых (рис. 13.10,В). Эти прямые перпендикулярны плоскости, определяемой векторами $\mathbf{a}$ и $\mathbf{b}$. Экспериментально рассеянная интенсивность будет наблюдаться повсюду, где геометрия падающего и дифрагировавшего излучений обеспечивает появление вектора рассеяния, идущего из начала координат в точку, принадлежащую одной из семейства параллельных прямых.

Большие ограничения, накладываемые на рассеяние двумерной решеткой, приводят к тому, что при меньшем числе наборов рассеивающих углов 2θ в них будет сконцентрирована большая интенсивность. Влияние двумерной решетки, оказываемое на экспериментально наблюдаемую картину рассеяния, иллюстрируется схематически на рис. 13.11. Плоскость двумерной решетки перпендикулярна направлению падающих рентгеновских лучей. Если такую решетку считать комбинацией двух взаимно перпендикулярных одномерных решеток, то каждая одномерная решетка даст свою систему параллельных полос. Картина рентгеновской дифракции является «произведением» двух систем полос. В этом случае рассеянная интенсивность, регистрируемая пленкой, предстанет в виде систем пятен, каждое из которых появляется в месте пересечения двух отдельных полос. (Примеры оптической дифракции на двумерных решетках приведены в Дополнении 13.4.)

РЕНТГЕНОВСКОЕ РАССЕЯНИЕ ОТ ТРЕХМЕРНОЙ АТОМНОЙ РЕШЕТКИ

Математически легко обобщить предыдущее рассмотрение на трехмерный случай, но не столь легко сделать наглядным результат этого обобщения. В случае структурной ор-

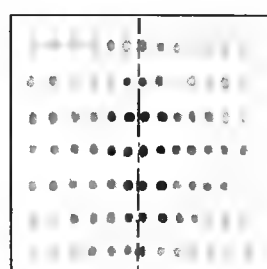
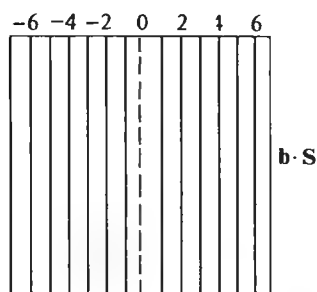
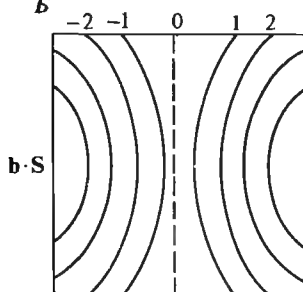
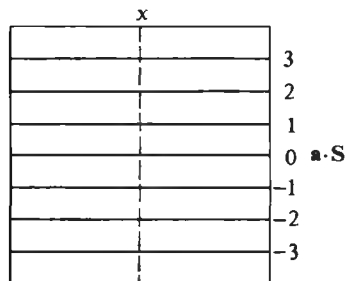
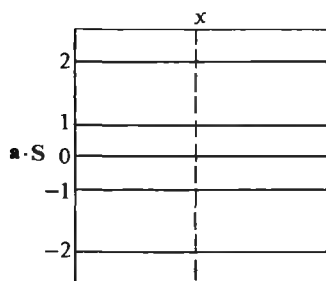
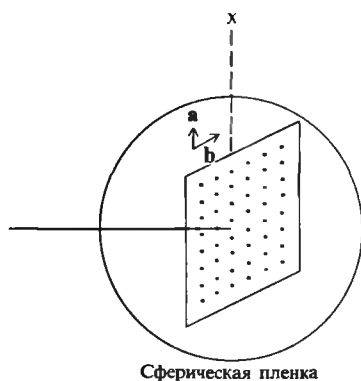
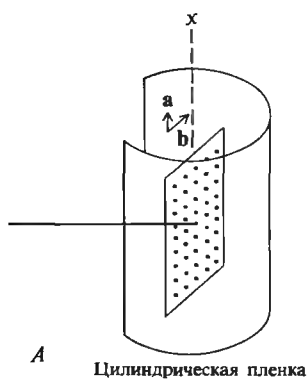


РИС. 13.11. Рассеяние рентгеновских лучей, наблюдаемое в лаборатории в случае двумерной периодической решетки, плоскость которой перпендикулярна направлению падающего пучка. Левая и правая половины рисунка иллюстрируют картины дифракции, получающиеся на цилиндрической и сферической пленках соответственно. **A.** Геометрии съемки. **Б.** Слоевые линии, появляющиеся вследствие периодичности a решетки. **В.** Слоевые линии, обусловленные периодичностью b решетки. **Г.** Реально наблюдаемое рассеяние, которому соответствует произведение функций, представленных на фрагментах **Б** и **В**, и атомной картины рассеяния, показанной на рис. 13.9,Б.

ганизации, характерной для реальных трехмерных кристаллов, добавляется еще одна периодичность, определяемая вектором $\mathbf{c}$ (рис. 13.12,А), что приводит к появлению третьего набора параллельных плоскостей $\mathbf{S} \cdot \mathbf{c} = l$, где $l = 0, \pm 1, \pm 2, \dots$. Этот набор плоскостей пересекает параллельные прямые, определяемые совместными условиями $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = h$ и $\mathbf{S} \cdot \mathbf{b} = k$. В результате возникает трехмерная решетка, узлы которой отстоят друг от друга на $1/|\mathbf{a}|$ в направлении, параллельном $\mathbf{a}$, на $1/|\mathbf{b}|$ в направлении, параллельном $\mathbf{b}$, и на $1/|\mathbf{c}|$ в направлении, параллельном $\mathbf{c}$ (рис. 13.12,Б). Дифрагировавшее излучение будет наблюдаться только тогда, когда вектор рассеяния $\mathbf{S}$ оканчивается в одной из точек этой решетки. Иллюстрировать картину дифракции от трехмерного кристалла нелегко, так как эта картина трехмерна.

Заметим, что решетка, соответствующая разрешенным геометриям рассеяния, отлична от точечной решетки, описывающей положения атомов в трехмерном кристалле. Последняя задается векторами $\mathbf{a}$, $\mathbf{b}$ и $\mathbf{c}$, тогда как решетка дифракции — векторами $\mathbf{a}^*$, $\mathbf{b}^*$ и $\mathbf{c}^*$, имеющими обратную размерность. Эта решетка рассеяния называется обратной решеткой. Векторное пространство, в котором существует обратная решетка, — обратное пространство (рис. 13.12,В).

В прямой трехмерной решетке (кристалле), которую мы рассмотрели выше, повторяющейся единицей структуры является один атом. Положения атомов соответствует система ячеек, ограниченных векторами (ребрами) $\mathbf{a}$, $\mathbf{b}$ и $\mathbf{c}$ (рис. 13.12,А). Положения атомов удобно описывать в координатах системы, связанной с этими векторами. Вектор, проведенный из начала координат в точку, где находится j -й атом, есть $\mathbf{r} = x\mathbf{a} + y\mathbf{b} + z\mathbf{c}$. Поскольку атомы лежат в вершинах ячеек, x , y и z должны быть целыми числами.

Вектор $\mathbf{r}$ можно использовать при расчете рассеяния от атомной решетки. Из уравнения (13.27) следует, что структурный фактор есть сумма по всем положениям атомов:

$$F_{\text{сумм}}(\mathbf{S}) = \sum_x \sum_y \sum_z f(\mathbf{S}) e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot (x\mathbf{a} + y\mathbf{b} + z\mathbf{c})} \quad (13.36)$$

Вводя условия Лауэ ($\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = h$ и т.д.), можно переписать это в следующем виде:

$$F_{\text{сумм}}(h, k, l) = \sum_x \sum_y \sum_z f(\mathbf{S}) e^{2\pi i(hx + ky + lz)} \quad (13.37)$$

где h , k и l — любые целые числа. Для каждого дифрагировавшего луча выбираются соответствующие целые h , k и l , а потом проводится суммирование по всей атомной решетке. Легко заметить, что в случае решетки из тождественных атомов каждый экспоненциальный член в (13.37) равен единице, так как h , k , l , x , y и z — целые числа. Поэтому выражение (13.37) превращается в

$$F_{\text{сумм}}(h, k, l) = Nf(\mathbf{S}) \quad (13.38)$$

где N — число атомов в решетке, а $f(\mathbf{S})$ — атомный рассеивающий фактор, который теперь «светится» только при тех значениях $\mathbf{S}$, которые разрешены выбором целых чисел h , k и l . Таким образом, рентгеновское рассеяние в нашем случае — это не что иное, как рассеяние от одного атома, «отобранное» во всех точках обратного пространства, которые определяются условиями Лауэ, налагаемыми прямой решеткой.

В силу дискретности картины дифракции выражение (13.37) — это не фурье-преобразование, а просто ряд Фурье. Однако он допускает точно такой же обратный переход, что и фурье-преобразование. По аналогии с выражением (13.8) распределение электронной плотности в атомной решетке дается следующим выражением:

$$\rho(x, y, z) = (1/NV) \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} F_{\text{сумм}}(h, k, l) e^{-2\pi i(hx + ky + lz)} \quad (13.39)$$

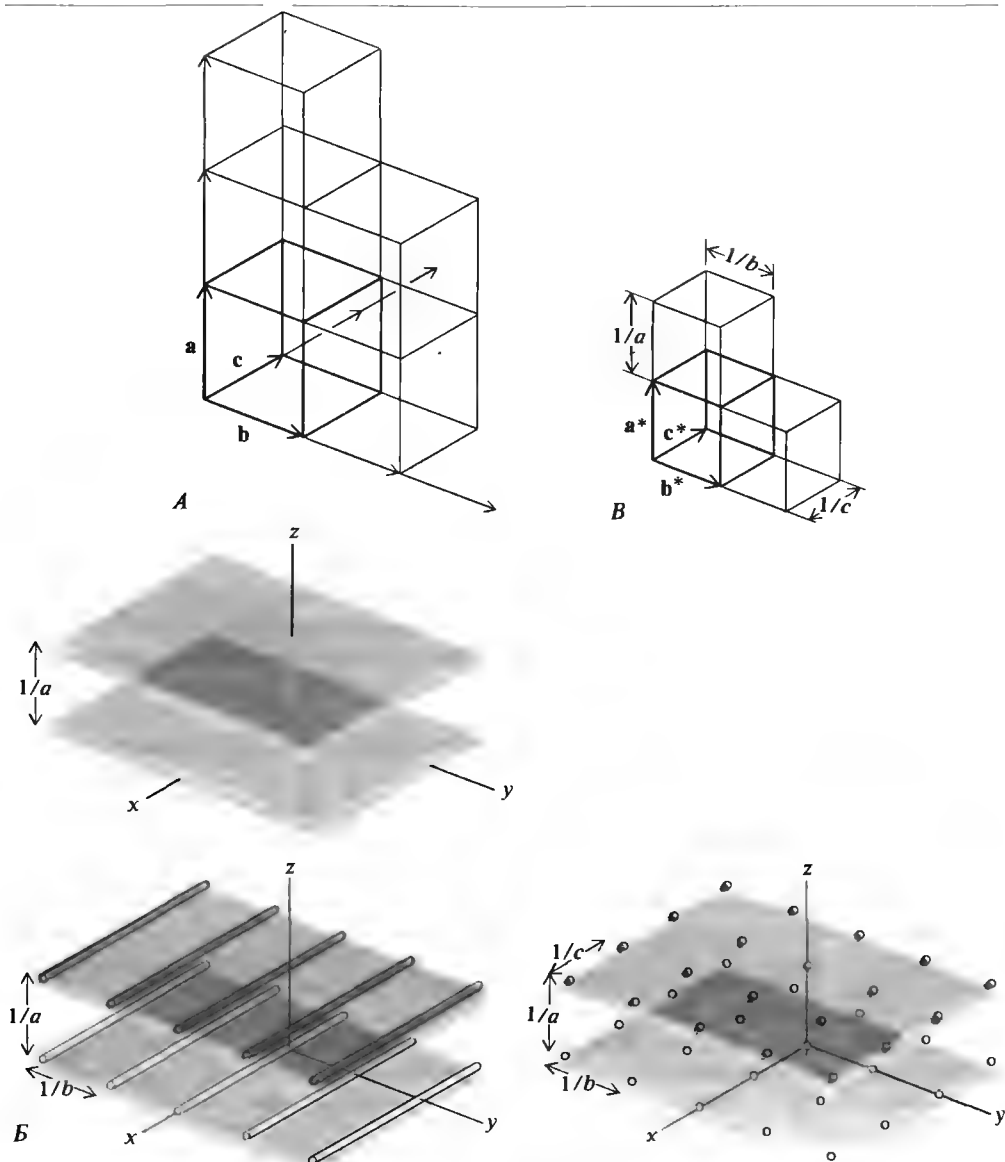


РИС. 13.12. Трехмерные решетки. А. Векторы $\mathbf{a}$, $\mathbf{b}$ и $\mathbf{c}$, определяющие трехмерную решетку. Б. Плоскости, обусловленные каждой из одномерных периодичностей, пересекаются и дают прямые для каждой из двумерных периодичностей и точки для трехмерной периодичности. Система получающихся точек образует обратную решетку. В. Обратная решетка определяется векторами $\mathbf{a}^*$, $\mathbf{b}^*$ и $\mathbf{c}^*$. Показано несколько ячеек обратной решетки. Ресейная интенсивность наблюдается для вектора рассеяния, идущих из начала координат в эти точки.

где V — объем одной элементарной ячейки [$V = \mathbf{a} \cdot (\mathbf{b} \times \mathbf{c})$], так что NV — объем всего кристалла. Появление множителя $1/V$ в выражении (13.39) легко объяснить: $F(h, k, l)$ пропорционально числу электронов, тогда как ρ (электронная плотность) измеряется числом электронов в единице объема.

РЕНТГЕНОВСКОЕ РАССЕЯНИЕ ОТ ТРЕХМЕРНОГО КРИСТАЛЛА, СОСТОЯЩЕГО ИЗ МОЛЕКУЛ

Выражения (13.37) — (13.39) были получены для решетки, у которой в вершине каждой ячейки находится лишь один атом; однако нетрудно показать, что аналогичные выражения справедливы для любого реального кристалла. Повторяющимся элементом является элементарная ячейка. Кристалл — решетка из элементарных ячеек, каждая из которых определена векторами $\mathbf{a}$, $\mathbf{b}$ и $\mathbf{c}$ (рис. 13.12, А). Независимо от того, что находится внутри каждой ячейки — атом, одна или несколько молекул, — распределение электронной плотности в кристалле периодически повторяется в результате трансляций вдоль векторов $\mathbf{a}$, $\mathbf{b}$ и $\mathbf{c}$. Поэтому условия Лауэ остаются в силе и «вырезают» из структурного фактора только его значения в точках обратной решетки. Но структурный фактор теперь — это не атомный рассеивающий фактор. Это молекулярный структурный фактор, или структурный фактор элементарной ячейки, определяемый выражением (13.27). Чтобы показать это, полезно воспользоваться математической операцией свертки.

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ПОВТОРЯЮЩЕЙСЯ СТРУКТУРЫ В ВИДЕ СВЕРТКИ

Рентгеновская дифракция выявляет одновременно и свойства кристаллической решетки, и структуру отдельных молекул. Распределение электронной плотности во всех элементарных ячейках идентично. При помощи решетки мы описываем, как это распределение «размножается» в трехмерную периодическую структуру. Такую повторяющуюся структуру очень удобно представить в виде свертки.

Рассмотрим две произвольные одномерные функции $f(x)$ и $g(x)$. Обе они заданы на оси x . Их свертка определяется следующим образом:

$$\widehat{fg}(u) = \int_{-\infty}^{\infty} dx f(x)g(u-x) \quad (13.40)$$

где переменная u может принимать любые значения из числа принимаемых x . Она эквивалентна x , за исключением того, что при интегрировании должна оставаться постоянной.

Попытаемся выяснить физический смысл свертки. Для этого обратимся к рис. 13.13, А. Функция g переменной u идентична функции $g(x)$, т.е. той же функции переменной x . Функция $g(u-x)$ — это та же функция переменной u , но смещенная вдоль оси u на расстояние x . Отсюда следует, что при свертывании с функцией $f(x)$ функция $g(u)$ помещается последовательно во все точки оси u , но каждый раз, когда смещение равно x , к ней добавляется весовой множитель $f(x)$. Все взвешенные таким образом значения функции g складываются или интегрируются и дают результат, называемый сверткой.

Физически свертка $\widehat{fg}(u)$ означает, что мы выстраиваем последовательные изображения g , взвешенные при помощи f ¹⁾. Оказывается, что результат не изменится, если мы скажем, что выстраиваем изображения f , взвешенные при помощи g . Чтобы убедиться в этом, положим в выражении (13.40) $u-x = x'$. Тогда $dx' = -dx$ и (учитывая обращение пределов интегрирования) получаем

$$\widehat{fg}(u) = - \int_{+\infty}^{-\infty} dx' f(u-x')g(x') = g\widehat{f}(u) \quad (13.41)$$

Предположим теперь, что функция g есть дельта-функция Дирака $\delta(x-a)$, т.е. $g(x) = \delta(x-a)$. Тогда $g(u-x) = \delta[(u-x)-a] = \delta[(u-a)-x]$ и свертка

¹⁾ Если в этом месте у вас нет абсолютной ясности, прервите чтение. Внимательно изучите рис. 13.13 и попытайтесь произвести свертку простейших на ваш взгляд функций.

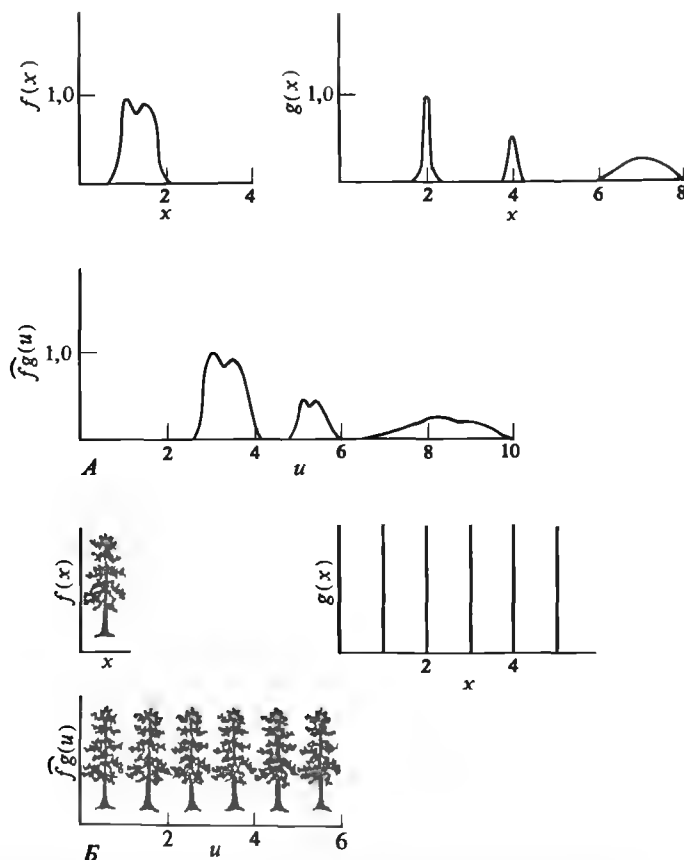


РИС. 13.13. Иллюстрация свертки. А. Две функции, f и g , и их свертка, рассчитанная по (13.40). Б. Две функции, f (дерево) и g (решетка, набор дельта-функций), и их свертка.

$$\hat{f}\delta(u) = \int_{-\infty}^{\infty} dx f(x) \delta[(u - a) - x] = f(u - a) \quad (13.42)$$

просто сдвигает функцию f на расстояние a вдоль оси u . Все эти результаты справедливы и в трехмерном случае, когда свертка записывается в виде

$$\hat{f}g(u) = \int d\mathbf{r} f(\mathbf{r}) g(u - \mathbf{r}) \quad (13.43)$$

Если g — трехмерная дельта-функция $\delta(\mathbf{r} - \rho)$, то свертка (13.43) просто сдвигает функцию $f(\mathbf{r})$ вдоль вектора ρ в системе координат вектора u .

Дельта-функциями можно воспользоваться для описания решетки. Достаточно определить, где находится начало каждой элементарной ячейки. В одномерном случае таким началом может быть любое целое кратное вектора a ; это ограничивает значения x , определяющие начало любой ячейки, величиной na . Соответствующей функцией будет $\delta(x - na)$. Тогда бесконечную одномерную решетку можно задать функцией

$$L(x) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \delta(x - na) \quad (13.44)$$

Эта функция описывает все узлы одномерной решетки.

Предположим теперь, что распределение электронной плотности внутри одной ячейки есть $\rho(x)$. Чтобы описать весь кристалл, необходимо «повторить» эту электронную плотность в каждой элементарной ячейке. Исходя из свойств свертки, описанных выше, это достигается следующим образом:

$$\text{Кристалл} = \widehat{\rho L}(u) = \int_{-\infty}^{\infty} \rho(x) dx \sum_{n=-\infty}^{\infty} \delta[(u - na) - x] = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \rho(u - na). \quad (13.45)$$

Свертка $\widehat{L\rho}$ просто встраивает «изображение» структуры в каждую элементарную ячейку (рис. 13.13,Б).

В случае трех измерений бесконечную решетку можно представить как

$$L(\mathbf{r}) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{m=-\infty}^{\infty} \sum_{p=-\infty}^{\infty} \delta(\mathbf{r} - n\mathbf{a} - m\mathbf{b} - p\mathbf{c}) \quad (13.46)$$

где n , m и p — любые целые числа. Электронная плотность внутри одной ячейки есть $\rho(\mathbf{r})$, а для всего кристалла имеем

$$\text{Кристалл} = \widehat{\rho L}(\mathbf{u}) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{m=-\infty}^{\infty} \sum_{p=-\infty}^{\infty} \rho(\mathbf{u} - n\mathbf{a} - m\mathbf{b} - p\mathbf{c}) \quad (13.47)$$

Таким образом, любой кристалл можно представить как свертку содержимого элементарной ячейки с решеткой.

ФУРЬЕ-ПРЕОБРАЗОВАНИЕ СВЕРТКИ

Свертка обладает свойством, которое делает ее особенно полезной при описании рентгеновского рассеяния. Пусть $f(\mathbf{r})$ и $g(\mathbf{r})$ — функции, являющиеся соответственно фурье-преобразованиями функций $F(\mathbf{S})$ и $G(\mathbf{S})$:

$$f(\mathbf{r}) = \int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{S} F(\mathbf{S}) e^{-2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} \quad (13.48a)$$

$$g(\mathbf{r}) = \int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{S} G(\mathbf{S}) e^{-2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}}$$

и, следовательно, F и G — обратные преобразования функций f и g , т.е.

$$F(\mathbf{S}) = \int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{r} f(\mathbf{r}) e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} \quad (13.49a)$$

$$G(\mathbf{S}) = \int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{r} g(\mathbf{r}) e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} \quad (13.49b)$$

Тогда свертку двух исходных функций можно записать в виде

$$\begin{aligned}\widehat{fg}(\mathbf{u}) &= \int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{r} f(\mathbf{r}) g(\mathbf{u} - \mathbf{r}) = \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{r} \int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{S} F(\mathbf{S}) e^{-2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} \int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{S}' G(\mathbf{S}') e^{-2\pi i \mathbf{S}' \cdot (\mathbf{u} - \mathbf{r})}\end{aligned}\quad (13.50)$$

Меняя порядок интегрирования, получаем

$$\widehat{fg}(\mathbf{u}) = \int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{S} F(\mathbf{S}) \int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{S}' G(\mathbf{S}') e^{-2\pi i \mathbf{S}' \cdot \mathbf{u}} \int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{r} e^{2\pi i (\mathbf{S}' - \mathbf{S}) \cdot \mathbf{r}} \quad (13.51)$$

Третий интеграл есть не что иное, как дельта-функция Дирака $\delta(\mathbf{S}' - \mathbf{S})$ (см. Дополнение 13.3). Поэтому результатом второго интегрирования будет просто подынтегральная функция при $\mathbf{S}' = \mathbf{S}$, и выражение (13.51) примет вид

$$\widehat{fg}(\mathbf{u}) = \int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{S} F(\mathbf{S}) G(\mathbf{S}) e^{-2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{u}} \quad (13.52)$$

Легко видеть, что выражение (13.52) есть фурье-преобразование произведения двух функций $F(\mathbf{S})$ и $G(\mathbf{S})$. Это очень важный результат. Фурье-преобразованием произведения двух функций F и G является свертка фурье-образов f и g .

Применив фурье-преобразование к выражению (13.52), можно получить второй важный результат, а именно:

$$\begin{aligned}\int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{u} e^{2\pi i \mathbf{S}' \cdot \mathbf{u}} \widehat{fg}(\mathbf{u}) &= \int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{u} \int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{S} F(\mathbf{S}) G(\mathbf{S}) e^{-2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{u}} e^{2\pi i \mathbf{S}' \cdot \mathbf{u}} = \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{S} F(\mathbf{S}) G(\mathbf{S}) \int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{u} e^{2\pi i (\mathbf{S}' - \mathbf{S}) \cdot \mathbf{u}}\end{aligned}\quad (13.53)$$

Однако второй интеграл есть дельта-функция Дирака $\delta(\mathbf{S}' - \mathbf{S})$. Таким образом,

$$\int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{u} e^{2\pi i \mathbf{S}' \cdot \mathbf{u}} \widehat{fg}(\mathbf{u}) = F(\mathbf{S}') G(\mathbf{S}') \quad (13.54)$$

Фурье-образом свертки является произведение фурье-образов входящих в нее функций.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СВЕРТОК ПРИ РАСЧЕТЕ КАРТИН РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ

Рассмотрим одномерный кристалл, состоящий из молекул. Внутри каждой элементарной ячейки распределение электронной плотности есть $\rho_m(\mathbf{r})$. Рентгеновское рассеяние от содержимого одной ячейки, помещенной в начале координат, дается выражением (13.7)

$$F_m(\mathbf{S}) = \int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{r} \rho_m(\mathbf{r}) e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} \quad (13.55)$$

Решетка порождена вектором $\mathbf{a}$ и ее можно описать выражением (13.44) для трехмерного

случая ¹⁾

$$L(\mathbf{r}) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \delta(\mathbf{r} - n\mathbf{a}) \quad (13.56)$$

Структура кристалла задается сверткой

$$\widehat{\rho_m} L(\mathbf{u}) = \int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{r} \rho_m(\mathbf{r}) \sum_{n=-\infty}^{\infty} \delta[(\mathbf{u} - n\mathbf{a}) - \mathbf{r}] \quad (13.57)$$

В соответствии с (13.7) рентгеновское рассеяние от кристалла описывается выражением

$$F_{\text{сумм}}(\mathbf{S}) = \int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{r} e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} \widehat{\rho_m} L(\mathbf{u}) \quad (13.58)$$

Его можно преобразовать, используя (13.54) и (13.49) и заменяя $\mathbf{u}$ эквивалентной переменной $\mathbf{r}$, к виду

$$F_{\text{сумм}}(\mathbf{S}) = \left(\int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{r} \rho_m(\mathbf{r}) e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} \right) \left(\int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{r} \sum_{n=-\infty}^{\infty} \delta(\mathbf{r} - n\mathbf{a}) e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} \right) \quad (13.59)$$

Первый член есть не что иное, как структурный фактор элементарной ячейки $F_m(\mathbf{S})$ [уравнение (13.55)]. Второй член — вырезающая функция, порожденная решеткой, $F_L(\mathbf{S})$. Его легко вычислить, если воспользоваться свойствами дельта-функции. В результате будем иметь

$$F_{\text{сумм}}(\mathbf{S}) = F_m(\mathbf{S}) F_L(\mathbf{S}) = F_m(\mathbf{S}) \sum_{n=-\infty}^{\infty} e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot n\mathbf{a}} \quad (13.60)$$

Этот результат аналогичен по форме (13.31), но теперь он имеет более общий вид, поскольку справедлив для кристаллов из молекул. Приведенный пример подчеркивает правильность и простоту подхода, использующего в качестве своего инструмента свертку. Однако настоящее преимущество такого подхода, если привыкнуть к нему, состоит в более глубоком проникновении в физический смысл явления.

Из выражений (13.59) и (13.60) следует, что для расчета картины рентгеновского рассеяния надо просто умножить рассеяние от одной ячейки на вырезающую функцию, обусловленную решеткой.

Приведем еще один пример, демонстрирующий полезность такого подхода. Рассмотрим бесконечный одномерный кристалл с длиной элементарной ячейки $2a$ и с двумя атомами в ней; один располагается против вертикальной черточки, другой — посередине между двумя такими черточками:



Рассчитаем рассеяние от такого кристалла. В соответствии с (13.59) структурный фактор элементарной ячейки имеет вид

$$F_m(\mathbf{S}) = \int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{r} \rho_m(\mathbf{r}) e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} = f(\mathbf{S})(1 + e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{a}}) \quad (13.61)$$

¹⁾ Даже в случае одномерного кристалла формально следует рассматривать трехмерную картину дифракции, так как на рассеяние будет влиять относительная ориентация молекулы в решетке.

где мы использовали определение атомного рассеивающего фактора. Следует рассматривать только два атома — один над вертикальной черточкой (скажем, в начале координат), а другой в центре элементарной ячейки, поскольку атом, сдвинутый на $2a$ от начала координат, принадлежит следующей ячейке, а атом в положении $-a$ (относительно начала координат) — предыдущей ячейке.

При такой решетке вырезающая функция имеет вид

$$F_L(S) = \int_{-\infty}^{\infty} dr \sum_{n=-\infty}^{\infty} \delta(r - 2na) e^{2\pi i S \cdot r} = \sum_{n=-\infty}^{\infty} e^{4\pi i n S \cdot a} \quad (13.62)$$

Таким образом, рассеяние от этого кристалла будет описываться выражением

$$\begin{aligned} F_{\text{сумм}}(S) &= f(S)(1 + e^{2\pi i S \cdot a}) \sum_{n=-\infty}^{\infty} e^{4\pi i n S \cdot a} \\ &= f(S) \sum_{n=-\infty}^{\infty} (e^{4\pi i n S \cdot a} + e^{4\pi i (n+1/2) S \cdot a}) \end{aligned} \quad (13.63)$$

Расписывая почленно сумму в (13.63), получим в конце концов

$$F_{\text{сумм}}(S) = f(S) \sum_{n=-\infty}^{\infty} e^{2\pi i n S \cdot a} \quad (13.64)$$

Последнее выражение идентично выражению (13.31) и иллюстрирует следующий важный результат: рассеяние, рассчитанное для кристалла, не зависит от того, каким способом выбрать элементарную ячейку.

РАСЧЕТ ДИФРАКЦИИ ОТ МОЛЕКУЛЯРНОГО КРИСТАЛЛА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СВЕРТОК

Для рассмотрения реального кристалла надо обобщить выражения (13.55) и (13.56) на трехмерный случай. Кристалл «порождается» сверткой $\rho_m \tilde{L}$, где $L(r)$ дается выражением (13.46). Если точно следовать ходу рассуждений, использованному при выводе выражений (13.59) и (13.60), то для структурного фактора кристалла получим

$$F_{\text{сумм}}(S) = F_m(S) \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{m=-\infty}^{\infty} \sum_{p=-\infty}^{\infty} e^{2\pi i (nS \cdot a + mS \cdot b + pS \cdot c)} \quad (13.65)$$

Здесь тройная сумма — это трехмерная вырезающая функция, обусловленная решеткой. Она ограничивает возможность наблюдения рассеянной интенсивности геометриями, разрешенными условиями Лауэ. В соответствии с этими условиями $S \cdot a = h$, $S \cdot b = k$, а $S \cdot c = l$, так что

$$F_{\text{сумм}}(h, k, l) = F_m(S) \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{m=-\infty}^{\infty} \sum_{p=-\infty}^{\infty} e^{2\pi i (nh + mk + pl)} \quad (13.66)$$

Теперь каждый экспоненциальный член становится равным единице, и тройная сумма, упрощаясь, принимает вид

$$F_{\text{сумм}}(h, k, l) = N F_m(S) \quad (13.67)$$

где N — число элементарных ячеек в кристалле.

Удобно расписать структурный фактор элементарной ячейки $F_m(\mathbf{S})$ подробно, выразив его через положения каждого атома и соответствующие атомные рассеивающие факторы. Используя уравнения (13.27) для молекулярного структурного фактора, воспользуемся системой координат, связанной с векторами $\mathbf{a}$, $\mathbf{b}$ и $\mathbf{c}$. Положение j -го атома в элементарной ячейке определяется тогда выражением

$$\mathbf{r}_j = x_j \mathbf{a} + y_j \mathbf{b} + z_j \mathbf{c} \quad (13.68)$$

и уравнение (13.27) превращается в

$$F_m(\mathbf{S}) = \sum_j f_j(\mathbf{S}) e^{2\pi i(x_j \mathbf{S} \cdot \mathbf{a} + y_j \mathbf{S} \cdot \mathbf{b} + z_j \mathbf{S} \cdot \mathbf{c})} \quad (13.69)$$

где суммирование проводится по всем атомам в элементарной ячейке. Если же теперь ввести условия Лауэ, то (13.69) упростится до

$$F_m(h, k, l) = \sum_j f_j(\mathbf{S}) e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)} \quad (13.70)$$

Это уравнение называется уравнением структурного фактора. Оно представляет рентгеновское рассеяние от элементарной ячейки, отбираемое в узлах обратной решетки h , k и l .

Уравнение (13.70) — одно из ключевых в рентгеновском структурном анализе. Оно дает прямой способ расчета картины дифракции от кристалла при условии, что известна структура элементарной ячейки. Наоборот, если известен структурный фактор $F_m(h, k, l)$, можно рассчитать распределение электронной плотности в кристалле. Для этого надо воспользоваться уравнением, идентичным уравнению (13.39). Однако вместо того, чтобы использовать для описания вклада элементарной ячейки уравнение (13.38), следует прибегнуть к соотношениям (13.67) и (13.70).

• ЗАКОН ДИФРАКЦИИ БРЭГГА

В наиболее элементарных изложениях, посвященных рентгеновской дифракции, рассматривается процесс отражения рентгеновских лучей от определенных плоскостей кристаллической решетки. Поскольку многие читатели, вероятно, встречались прежде с этим подходом, стоит показать, почему излагаемый выше подход является эквивалентным. Пусть узлами решетки будут вершины (узлы) элементарных ячеек. Система плоскостей решетки — это семейство наборов равноотстоящих параллельных плоскостей, проведенных так, что все узлы решетки принадлежат какому-либо члену этого семейства.¹⁾ Плоскости, проходящие через противоположные вершины ячеек, тоже являются таким набором (рис. 13.14, А). Данные плоскости отсекают на осях ($\mathbf{a}$, $\mathbf{b}$ и $\mathbf{c}$) отрезки, в точности соответствующие единичной трансляции решетки. Могут быть, однако, проведены и такие плоскости, с последовательно уменьшающимся расстоянием между ними, которые отсекают на оси $\mathbf{a}$ любые доли — $a/2$, $a/3$, ..., a/h — единичной трансляции (рис. 13.14, Б, В).

В трехмерном случае существуют плоскости решетки, которые пересекают оси в точках, отстоящих друг от друга на a/h по оси $\mathbf{a}$, на b/k по оси $\mathbf{b}$ и c/l по оси $\mathbf{c}$. Эти плоскости можно описать с помощью миллеровских индексов h , k и l . Отметим, что расстояние (d) между соседними плоскостями данного набора находится в обратном отношении к ве-

¹⁾ Для каждого такого набора характерно свое межплоскостное расстояние и свое направление, но важно понимать, что любому из наборов принадлежат сразу все точки решетки. — *Прим.перев.*

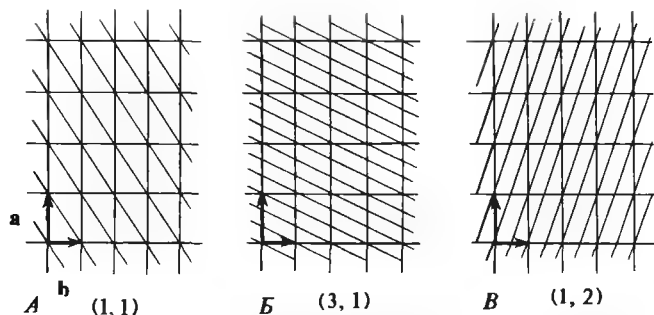


РИС. 13.14. Три набора плоскостей решетки. Внизу приведены соответствующие миллеровские индексы (h, k) .

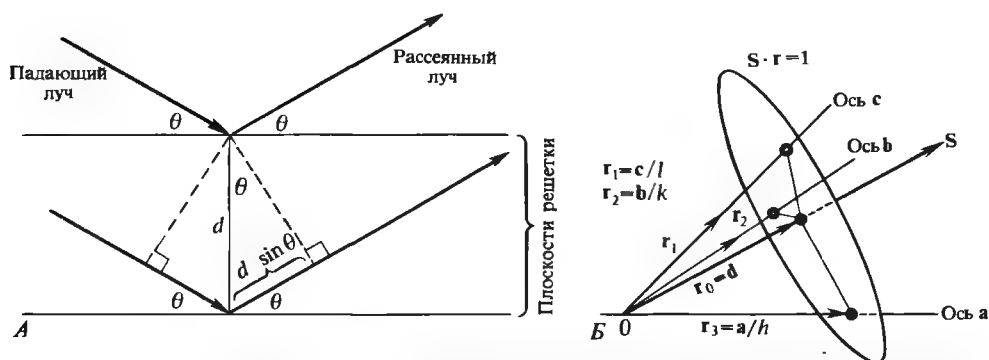


РИС. 13.15. Вывод закона Брэгга. А. Дифракция при отражении рентгеновских лучей от соседних плоскостей решетки. Б. Плоскость решетки (h, k, l) является плоскостью, в которой лежат концы векторов, удовлетворяющих условию Лауэ.

личине миллеровских индексов, соответствующих этому набору плоскостей. Поэтому вполне разумно предположить, что эти плоскости как-то связаны с обратной решеткой.

Описание дифракции по Брэггу исходит из того, что рентгеновские лучи, падающие на плоскость решетки под углом θ , отражаются от нее под таким же углом (рис. 13.15, А), что соответствует рассеянию на угол 2θ . Брэгговские условия наблюдения дифракционной картины требуют, чтобы разность хода между лучами, отраженными от соседних плоскостей решетки, равнялась целому числу длин волн. Из рис. 13.15, А ясно видно, что это условие выполняется, когда

$$2d \sin \theta = n\lambda. \quad (13.71)$$

где n — любое целое число, а d — межплоскостное расстояние. Для того чтобы можно было сравнивать брэгговское рассмотрение с приведенным выше подходом, необходимо показать, как вектор рассеяния $\mathbf{S}$ связан с плоскостями решетки. Рассмотрим плоскость решетки, которая пересекает три оси элементарной ячейки в точках $\mathbf{a}/h$, $\mathbf{b}/k$ и $\mathbf{c}/l$ (рис. 13.15, Б). Пусть $\mathbf{r}$ — вектор, проведенный из начала координат в любую точку плоскости. Посмотрим, каким должен быть вектор рассеяния $\mathbf{S}$, чтобы он удовлетворял условию $\mathbf{S} \cdot \mathbf{r} = 1$.

При фиксированном направлении $\mathbf{S}$ соотношение $\mathbf{S} \cdot \mathbf{r} = 1$ определяет плоскость, перпендикулярную $\mathbf{S}$, поскольку оно просто означает, что проекция $\mathbf{r}$ на $\mathbf{S}$ постоянна.

Как было показано раньше, рассеяние наблюдается не для всех векторов $\mathbf{S}$, а только для тех, которые удовлетворяют условиям Лауэ. Эти условия суть $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = h$ и эквивалентные выражения для $\mathbf{b}$ и $\mathbf{c}$. Их можно записать в виде

$$\mathbf{S} \cdot \mathbf{a}/h = \mathbf{S} \cdot \mathbf{b}/k = \mathbf{S} \cdot \mathbf{c}/l = 1 \quad (13.72)$$

Иначе говоря, векторы $\mathbf{a}/h$, $\mathbf{b}/k$ и $\mathbf{c}/l$ могут быть выбраны в качестве $\mathbf{r}$, чтобы выполнялось условие $\mathbf{S} \cdot \mathbf{r} = 1$. Эти три вектора однозначно определяют соответствующую плоскость (рис. 13.15, Б). Она представляет собой плоскость решетки (аналогичную представленным на рис. 13.14), но это также плоскость, в которой лежат концы векторов $\mathbf{S}$, дающих рентгеновскую дифракцию.

Плоскость, соседняя с плоскостью, определяемой условием $\mathbf{S} \cdot \mathbf{r} = 1$, будет проходить через начало координат. Расстояние d между этими двумя плоскостями — это длина вектора $\mathbf{r}_0$, параллельного $\mathbf{S}$ (рис. 13.15, Б). Условие $\mathbf{S} \cdot \mathbf{r}_0 = 1$ означает, что $d = |\mathbf{r}_0| = 1/|\mathbf{S}|$. Однако мы показали, что $|\mathbf{S}| = 2|\sin\theta|/\lambda$. Поэтому для угла рассеяния 2θ , соответствующего данному набору плоскостей решетки, разделенных расстоянием d , справедливо соотношение

$$\sin\theta = \lambda/2d \quad (13.73)$$

Оно идентично уравнению (13.71) при $n = 1$. Таким образом, мы видим, что брэгговское описание эквивалентно условиям Лауэ. (Для вывода закона Брэгга в его полном виде следует рассмотреть свойства плоскости, определяемой условием $\mathbf{S} \cdot \mathbf{r} = n$, где n — целое.)

13.3. Свойства кристаллов

Кристалл — это решетка из молекул, для которой характерна упорядоченность во всех трех измерениях. Однако из сказанного ранее ясно, что кристаллическое состояние не является обязательным для рентгеновских дифракционных измерений. Любая упорядоченная (или частично упорядоченная) решетка молекул может давать полезную рентгеноструктурную информацию. Но очевидно, что наиболее предпочтительными объектами являются именно кристаллы. Упорядоченная решетка атомов или молекул, обладающая достаточно большими размерами, дает четкие дифракционные пятна, когда интенсивность рассеянных рентгеновских лучей сосредотачивается в малых дискретных областях угла рассеяния 2θ . Это сильно облегчает процедуру получения надежных рентгеновских данных.

Если объектом служит не вполне идеальный кристалл, наблюдаемая интенсивность может достигать заметных значений в более широких областях углов рассеяния. Картина дифракции может размываться в кольца или полосы, что обуславливает существенную неточность в определении наблюдаемых значений θ . Вообще говоря, дифракционная картина будет содержать всю информацию, необходимую для восстановления трехмерной структуры, только если объект обладает достаточной трехмерной упорядоченностью. Разупорядочение соответствует усреднению ориентаций как решетки, так и составляющих ее молекул. Получающиеся дифракционные данные содержат тогда информацию лишь об усредненной структуре.

ОГРАНИЧЕНИЯ ДЛЯ ВОЗМОЖНЫХ КРИСТАЛЛИЧЕСКИХ РЕШЕТОК

По своей природе кристалл — это трехмерная мозаика. Основной повторяющейся единицей является элементарная ячейка, определяемая векторами $\mathbf{a}$, $\mathbf{b}$ и $\mathbf{c}$. Весь же кри-

65 ПРОСТРАНСТВЕННЫХ ГРУПП ДЛЯ МОЛЕКУЛ, НЕ ОБЛАДАЮЩИХ ЗЕРКАЛЬНОЙ
ИЛИ ИНВЕРСИОННОЙ СИММЕТРИЕЙ

Кристаллическая система	Число независимых параметров	Решетка	Минимальный набор элементов симметрии элементарной ячейки	Ребра и углы элементарной ячейки ¹⁾	Симметрия картины дифракции ²⁾	Пространственные группы ³⁾
Триклинная	6	<i>P</i>	Нет	$a \neq b \neq c$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma$	$\bar{1}$	<i>P</i> 1
Моноклинная	4	<i>P</i>	Поворотная ось симметрии 2-го порядка, параллельная b	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \gamma = 90^\circ$ $\beta \neq 90^\circ$	$2/m$	<i>P</i> 2, <i>P</i> 2 ₁ <i>C</i> 2
Ромбическая	3	<i>P</i> <i>C</i> <i>I</i> <i>F</i>	Три взаимно перпендикулярные поворотные оси 2-го порядка	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	<i>mmm</i>	<i>P</i> 22, <i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ <i>C</i> 222, <i>C</i> 222 ₁ [<i>I</i> 222, <i>I</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁], <i>F</i> 222
Тетрагональная	2	<i>P</i> <i>I</i>	Поворотная ось 4-го порядка, параллельная c	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$4/m$ $4/mmm$	<i>P</i> 4, (<i>P</i> 4 ₁ , <i>P</i> 4 ₂), <i>P</i> 4 ₃ <i>I</i> 4, <i>I</i> 4 ₁ <i>P</i> 422, (<i>P</i> 4 ₁ 22, <i>P</i> 4 ₂ 22), <i>P</i> 4 ₃ 22, <i>P</i> 42 ₁ 2, (<i>P</i> 4 ₁ 2 ₁ 2, <i>P</i> 4 ₂ 2 ₁ 2), <i>P</i> 4 ₃ 2 ₁ 2 <i>I</i> 422, <i>I</i> 4 ₁ 22 <i>R</i> 3 <i>P</i> 3, (<i>P</i> 3 ₁ , <i>P</i> 3 ₂) <i>R</i> 32
Тригональная, или ромбоэдрическая	2	<i>R</i> ⁴⁾ <i>P</i> ⁴⁾	Поворотная ось 3-го порядка, параллельная c	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$	$\bar{3}$ $\bar{3}m$	[<i>P</i> 321, <i>P</i> 312], [<i>P</i> 3 ₁ 21, <i>P</i> 3 ₂ 21], (<i>P</i> 3 ₁ 2, <i>P</i> 3 ₂ 12)] <i>P</i> 6, (<i>P</i> 6 ₁ , <i>P</i> 6 ₂), <i>P</i> 6 ₃ , (<i>P</i> 6 ₄ , <i>P</i> 6 ₅) <i>P</i> 622, (<i>P</i> 6 ₁ 22, <i>P</i> 6 ₂ 22), <i>P</i> 6 ₃ 22, (<i>P</i> 6 ₄ 22, <i>P</i> 6 ₅ 22)
Гексагональная	2	<i>P</i>	Поворотная ось 6-го порядка, параллельная c	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = 90^\circ$ $\gamma = 120^\circ$	$6/m$ $6/mmm$	

Кристаллическая система	Число независимых параметров	Решетка	Минимальный набор элементов симметрии элементарной ячейки	Ребра и углы элементарной ячейки ¹⁾	Симметрия картины дифракции ²⁾	Пространственные группы ³⁾
Кубическая	1	P I F	Поворотные оси 3-го порядка вдоль диагоналей куба	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$m\bar{3}$ $m\bar{3}m$	$P2_3, P2_13$ $[I23, I2_13]$ $F23$ $P432, (P4_32, P4_332), P4_22$ $I432, I4_143$ $F432, F4_332$

¹⁾ Определение значений ребер и углов см. на рис. 13.16.

²⁾ Цифрой с черточкой наверху обозначается поворотно-инверсионная ось; m — плоскость отражения (зеркальная плоскость); $2/m$ — зеркальная плоскость, перпендикулярная поворотной оси 2-го порядка; $6/m$ — зеркальная плоскость, перпендикулярная поворотной оси 6-го порядка.

³⁾ Пары пространственных групп в круглых скобках различаются только тем, что они являются энантиоморфами. Пространственные группы в квадратных скобках (а также в круглых скобках) нельзя отличить друг от друга с помощью систематических погасаний рефлексов, или отражений, в картине дифракции. Все другие пространственные группы однозначно определяются картиной дифракции.

⁴⁾ Ромбоэдрическую систему часто рассматривают как подвид гексагональной системы, и элементарные ячейки могут быть выбраны как с гексагональными, так и с ромбоэдрическими осями. [Eisenberg D. In: The Enzymes, 3s ed., vol. 1, P.D. Boyer, New York, Academic Press, 1970.]

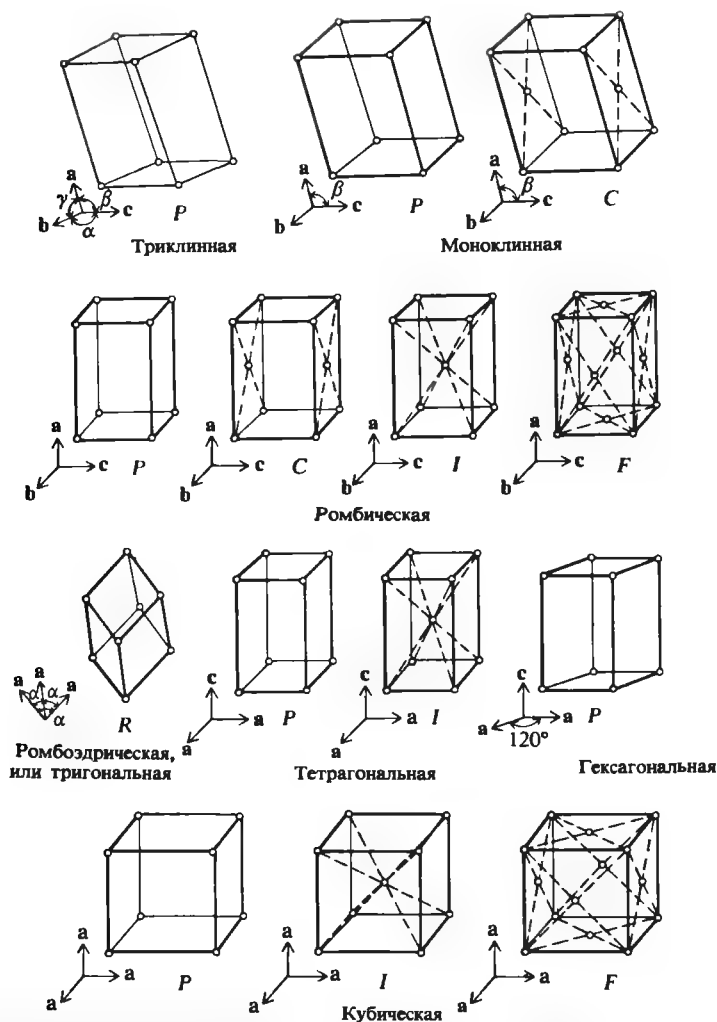


РИС. 13.16. Четырнадцать решеток Браве. Их характеристики приведены в табл. 13.1. (Stout G.H., Jensen L.M. X-Ray Structure Determination, New York, Macmillan, 1968.)

сталл порождается последовательными трансляциями элементарной ячейки вдоль осей a , b и c ; точно так же создается и мозаичный узор, состоящий из множества повторяющихся копий основной структуры. Фундаментальное следствие законов геометрии состоит в том, что трехмерное пространство может быть заполнено мозаикой из ячеек, имеющих определенные формы. На самом деле существует лишь семь основных типов элементарных ячеек. Каждый такой тип определяет отдельную кристаллическую систему (рис. 13.16; табл. 13.1).

В каждой ячейке заключен мотив (узор), который и является единицей, повторяющейся в кристалле с помощью трансляций решетки. Кристалл есть свертка мотива и решетки (рис. 13.17, А). Мотивом может быть один атом, молекула или несколько молекул.

Простейший из возможных кристаллов должен состоять из одного мотива, располагающегося с одной и той же ориентацией в каждой вершине элементарных ячеек. Имеется восемь вершин, и каждая из них принадлежит одновременно восьми ячейкам. Поэтому на каждую ячейку приходится один мотив. Такие решетки называются примитивными и обозначаются буквой P . Для любой решетки всегда можно выбрать примитивную триклинную элементарную ячейку. Это наименее симметричная элементарная ячейка. Все ре-

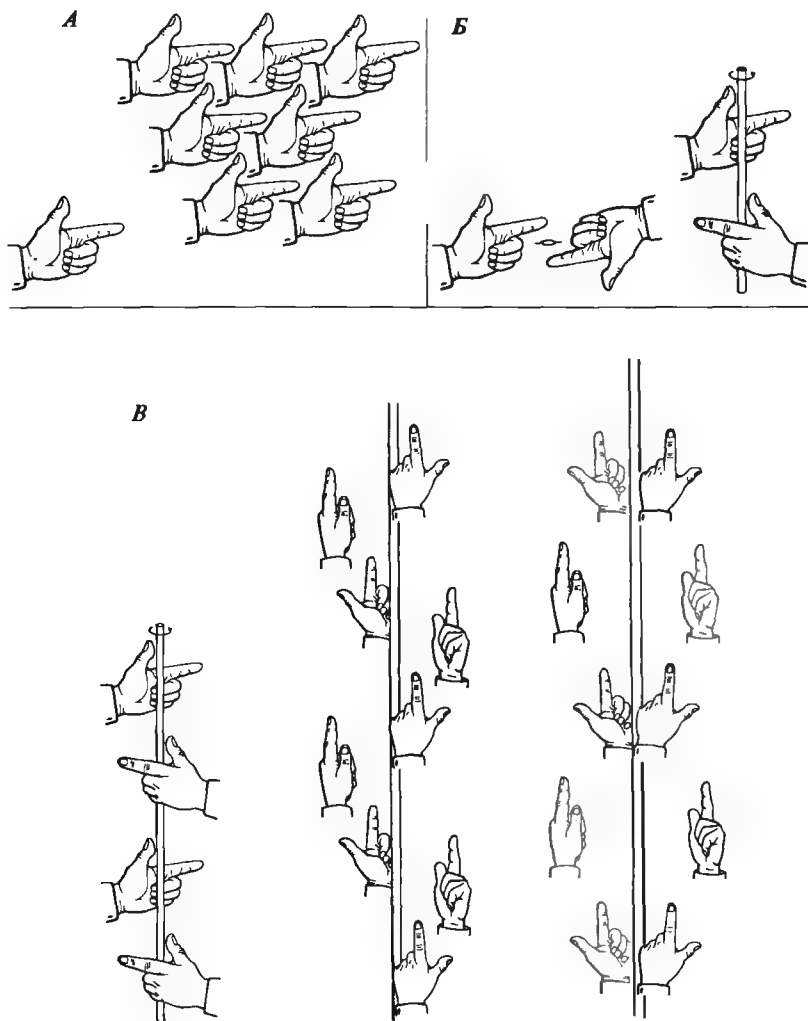


РИС. 13.17. Мотивы, решетки, операции симметрии. А. Решетка с простым мотивом (одна рука). Кристалл является сверткой мотива и решетки. Б. Два мотива с различной симметрией. Две руки слева связаны друг с другом поворотной осью симметрии 2-го порядка C_2 . Две руки справа связаны друг с другом винтовой осью асимметрии 2-го порядка 2_1 . В каждой структуре мотив состоит из двух рук. Асимметричной же единицей является одна рука. В. Узоры, порождаемые винтовыми осями. Слева направо: винтовые оси 2_1 , 4_1 и 4_2 ; элементарные ячейки содержат соответственно 2, 4 и 4 асимметричные единицы (рисунок Ирвинга Гейса).

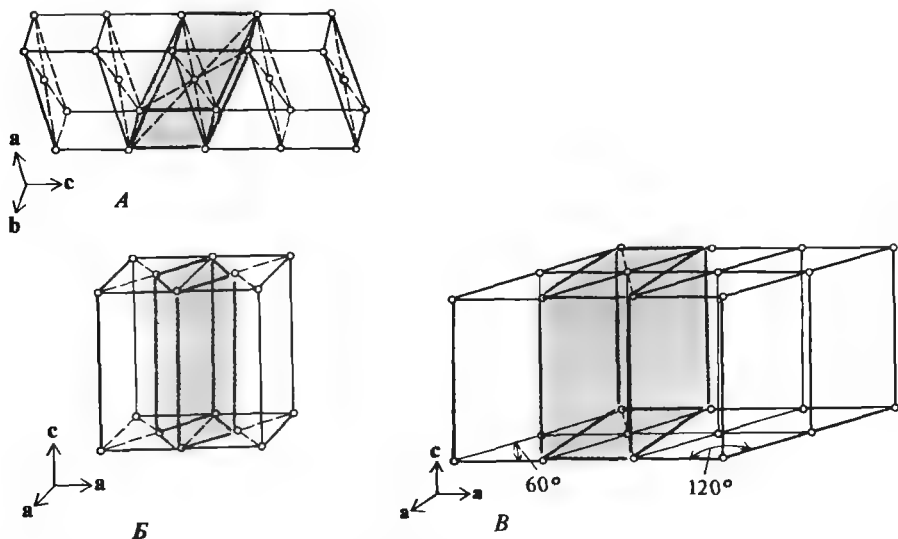


РИС. 13.18. Выбор различных элементарных ячеек для одной и той же решетки. А. Выбор элементарных ячеек *C* или *I* в случае моноклинной решетки. Б. Выбор элементарных ячеек *C* или *P* в случае тетрагональной решетки. В. Выбор ромбической (*C*) или гексагональной (*P*) ячеек. (Stout G.H., Jensen L.M. X-Ray Structure Determination, New York, Macmillan, 1968.)

бра и все углы у нее разные. Таким образом, для задания триклинной ячейки требуется шесть параметров.

Во многих случаях симметрию решетки можно увеличить, если выбрать большую элементарную ячейку так, чтобы она содержала дополнительные узлы, расположенные на ее гранях или в центре. В таких непримитивных решетках на элементарную ячейку приходится больше одной копии мотива. При соответствующем выборе непримитивной решетки часто можно описать элементарную ячейку меньшим числом параметров. Всего существует семь типов непримитивных решеток (см. рис. 13.16). Они обозначаются буквой *I*, если дополнительный узел располагается в центре ячейки, буквой *C*, если два дополнительных узла находятся на противоположных гранях ячейки, и буквой *F*, если дополнительные узлы располагаются на всех гранях ячейки. Легко убедиться, что решетки *C* и *I* содержат по два мотива на элементарную ячейку, тогда как решетка *F* — четыре мотива.

Важно понимать, что не всегда решетку можно выбрать единственным способом. Несколько примеров альтернативного выбора представлено на рис. 13.18. Существуют определенные общепринятые правила, позволяющие решить, какой решеткой пользоваться, но мы не будем их рассматривать; в любом случае их не всегда твердо придерживаются. Для каждого типа решетки существуют лишь определенные расположения молекул или мотивов, которые могут быть введены в нее без того, чтобы увеличить ее симметрию или уменьшить элементарную ячейку.

Выбор решетки может упрощать анализ данных рентгеновского рассеяния. Однако важно еще раз подчеркнуть (об этом уже говорилось), что рентгеновское рассеяние, рассчитанное для кристалла с известной структурой, не зависит от выбора решетки.

СИММЕТРИЯ МОЛЕКУЛ И КРИСТАЛЛОВ

Полную симметрию кристалла описывают пространственной группой. Сюда входит указание типа элементарной ячейки и свойств симметрии молекул, которые образуют мотив. Оказывается, что для произвольных структур существует ровно 230 возможных пространственных групп. Они включают в себя два типа симметрии: точечную симметрию и пространственную симметрию.

Операции точечной симметрии — это такие манипуляции над изолированным объектом, которые оставляют неизменной в пространстве по крайней мере одну его точку (см. Дополнение 2.3).

Им соответствуют:

- 1) *поворотные оси*, обозначаемые цифрой (2 для осей второго порядка, 3 для осей третьего порядка и т. д.);
- 2) *зеркальные плоскости*, обозначаемые буквой m ;
- 3) *зеркально-поворотные оси* (например, комбинация поворотной оси 2-го порядка с перпендикулярной ей зеркальной плоскостью, приводящая к инверсии объекта в точке, являющейся пересечением поворотной оси с плоскостью отражения; эта операция обозначается $2/m$);
- 4) *поворот-инверсионные оси*, обозначаемые цифрой с черточкой сверху (например, $\bar{4}$ означает, что каждый поворот на 90° сопровождается инверсией в начале координат).

Точечная группа — это совокупность всех элементов точечной симметрии, которыми обладает объект. Объект может быть молекулой, набором молекул или целым кристаллом. В гл. 2 показано несколько точечных групп, возможных для молекул, состоящих из множества копий идентичных субъединиц.

Операции пространственной симметрии подразумевают трансляцию объекта. Им соответствуют *винтовые оси* (поворот, сопровождаемый трансляцией) и *плоскости скольжения* (трансляции, сопровождаемые зеркальным отражением). Винтовые оси обозначаются n_m , где n — порядок поворотной оси, а m/n — доля элементарной ячейки, на которую происходит трансляция. Например, ось 3_1 означает поворот на 120° , сопровождаемый трансляцией на $1/3$ длины элементарной ячейки в направлении оси поворота. Описание плоскостей скольжения более сложно, так как оно зависит от того, вдоль какой грани или диагонали происходит скольжение, а также от того, на какое расстояние оно происходит. На рис. 13.17, В приведены некоторые примеры операций пространственной симметрии.

Присутствие особых элементов симметрии в самом мотиве накладывает ограничения на возможный тип элементарной ячейки. Например, если в пространственной группе присутствует поворотная ось 2-го порядка, эта ось должна быть перпендикулярна двум векторам элементарной ячейки. В противном случае эта операция симметрии оставляла бы мотив не измененным внутренне, но меняла бы его положение в элементарной ячейке. Наличие поворотных осей 3-го порядка (и выше) требует, чтобы два вектора элементарной ячейки, перпендикулярные этой оси, были бы одинаковой длины.

ПРОСТРАНСТВЕННЫЕ ГРУППЫ, ХАРАКТЕРНЫЕ ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ

Все разрешенные комбинации точечной и пространственной симметрии, которой обладает мотив, приводят к 230 пространственным группам. Удобно ввести понятие *асимметричной единицы*. Это наименьшая единица, из которой с помощью операций симметрии, присущих пространственной группе, можно получить всю кристаллическую структуру. Асимметричная единица может состоять из нескольких молекул, из одной молекулы или из субъединицы олигомерной молекулы. Кристалл порождается в результате созда-

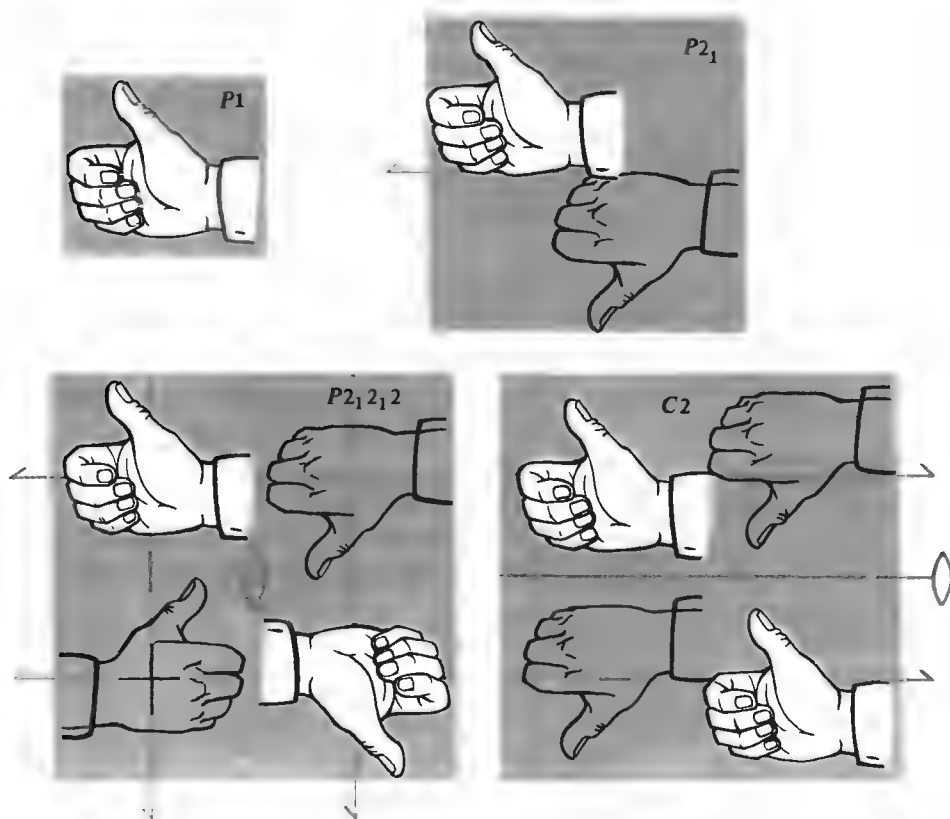


РИС. 13.19. Знакомая нам асимметричная единица, представленная в четырех различных пространственных группах. В пространственной группе $P1$ мотив не обладает собственной симметрией; в пространственной группе $P2_1$ есть одна винтовая ось 2_1 , показанная полустрелкой; в группе $P2_1 2_1 2$ есть четыре винтовые оси (каждая — 2_1) и поворотная ось C_2 , перпендикулярная плоскости страницы; в пространственной группе $C2$ — две винтовые оси 2_1 и поворотная ось C_2 , обозначенная знаком $\emptyset$ (рисунок Ирвинга Гейса).

ния мотива с помощью операций симметрии, присущих пространственной группе и производимых над асимметричной единицей, с последующей трансляцией мотива по решетке. Число асимметричных единиц в элементарной ячейке n' определяется пространственной группой.

В случае биологических молекул мотивы всегда содержат асимметричные углеродные атомы. Поэтому в элементах симметрии молекул никогда не содержатся зеркальные плоскости, плоскости скольжения, центры симметрии или поворотно-инверсионные оси. К биологическим молекулам приложимы только 65 из 230 пространственных групп. Встречающиеся в биологии пространственные группы могут содержать 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48 или 96 асимметричных единиц на элементарную ячейку (см. табл. 13.1).

когда вектор $\mathbf{S}$ параллелен $\mathbf{a}$, то длина вектора рассеяния $\mathbf{S}$ равна 0 при $h = 0$ и равна $1/a$ при $h = 1$. Угол рассеяния рассчитывается из уравнения (13.5); для $h = 0$ имеем $\sin \theta = 0$ и, следовательно, $\theta = 0$. Для $h = 1$ имеем $\sin \theta = \lambda |\mathbf{S}|/2 = \lambda/2a$. Следовательно, угол рассеяния между двумя рассеивающими плоскостями $2\theta = 2 \arcsin(\lambda/2a)$. Таким образом, если измерен угол θ и известна длина волны λ , можно рассчитать величину a .

В типичном случае λ и a могут равняться соответственно 1 и 10 Å. Следовательно, $\sin \theta = 1/20$, или $\theta \approx 3^\circ$. В обычной рентгеновской камере цилиндрическая пленка имеет радиус 28,65 мм. Длина окружности есть $2\pi \cdot 28,65$ мм. Угол между соответствующими точками на плоскостях $h = 0$ и $h = 1$ равен 2θ . Это 6° или $6/360$ длины окружности пленки. Поэтому расстояние на пленке между двумя пересекающимися ее плоскостями равно $2\pi \cdot 28,65 \cdot 6/360 \approx 3$ мм.

Отметим, что, хотя действительные расстояния в кристалле очень малы, пленка помещается далеко от образца. Поэтому дифракционную картину можно увеличивать до тех пор, пока соответствующие линии на пленке не будут разделены расстоянием, удобным для измерений. В случае кристалла неизвестной структуры все, что нужно проделать, — это произвести обратные вычисления, чтобы найти a . Необходимое для этого уравнение имеет вид $a = \lambda/2\sin(360D/4\pi r)$, где D — измеряемое расстояние на рентгеновской пленке, а r — радиус камеры.

СООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ ВЕКТОРАМИ ПРЯМОЙ И ОБРАТНОЙ РЕШЕТОК

Реальные кристаллы трехмерны. Обратная решетка, которую мы видим в картине дифракции, также трехмерна. Она связана с реальной кристаллической решеткой достаточно простым образом. Определяя пространственное распределение дифракционных пятен, можно рассчитать размеры ячейки и форму обратной решетки. Отсюда можно вывести размеры и форму элементарной ячейки реальной кристаллической решетки.

На рис. 13.21 показано, что каждый из векторов $\mathbf{a}^*$, $\mathbf{b}^*$ и $\mathbf{c}^*$, определяющих ячейку обратной решетки, располагается вдоль линий пересечения двух плоскостей. Например, вектор $\mathbf{c}^*$ лежит на линии пересечения плоскостей, связанных с последовательными значениями h в условии Лауэ $\mathbf{a} \cdot \mathbf{S} = h$ (следовательно, эти плоскости перпендикулярны $\mathbf{a}$), и плоскостей, порожденных соотношением $\mathbf{b} \cdot \mathbf{S} = k$ (т.е. перпендикулярных $\mathbf{b}$). Это означает, что $\mathbf{c}^*$ должен быть перпендикулярен одновременно и $\mathbf{a}$, и $\mathbf{b}$, и в общем случае можно написать

$$\mathbf{c}^* = r\mathbf{a} \times \mathbf{b} \quad (13.74a)$$

$$\mathbf{b}^* = q\mathbf{c} \times \mathbf{a} \quad (13.74b)$$

$$\mathbf{a}^* = p\mathbf{b} \times \mathbf{c} \quad (13.74v)$$

Константы в этих выражениях определяют величины векторов ячейки обратной решетки. Для нахождения этих констант надо воспользоваться условиями Лауэ, определяющими обратную решетку. Например, условие $\mathbf{S} \cdot \mathbf{c} = l$ дает ряд плоскостей, разделенных расстоянием $1/c$. Вектор $\mathbf{c}^*$ заключен между двумя такими плоскостями, хотя он не обязательно перпендикулярен им (рис. 13.21, Б). Однако проекция $\mathbf{c}^*$ на $\mathbf{c}$ должна быть равна $1/c$ (рис. 13.21, Б). Таким образом, мы можем написать

$$\mathbf{c} \cdot \mathbf{c}^* = |\mathbf{c}|(1/c) = 1 \quad (13.75)$$

Аналогичным образом можно показать, что $\mathbf{a} \cdot \mathbf{a}^* = 1$ и $\mathbf{b} \cdot \mathbf{b}^* = 1$.

Если (13.74) подставить в (13.75), то получим, что $1 = \mathbf{c} \cdot \mathbf{c}^* = r\mathbf{c} \cdot (\mathbf{a} \times \mathbf{b})$, откуда можно оценить r . Выполняя то же для $\mathbf{a}^*$ и $\mathbf{b}^*$, имеем

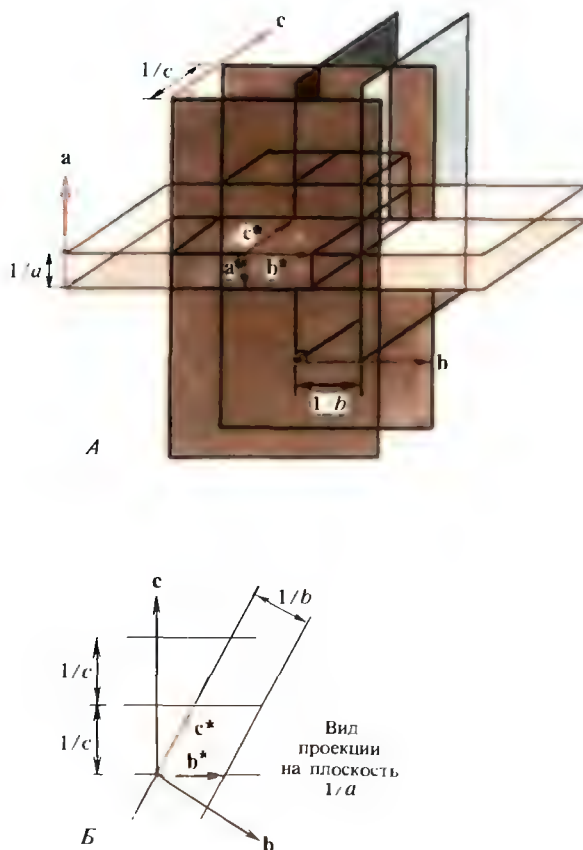


РИС. 13.21. Геометрические свойства обратной решетки. А. Векторы обратной решетки лежат на пересечениях рядов параллельных плоскостей. Например, вектор $\mathbf{c}^*$ заключен между двумя плоскостями, находящимися на расстоянии $1/|\mathbf{c}|$ друг от друга, но образован пересечением плоскостей, перпендикулярных $\mathbf{a}$ (разделенных расстоянием $1/|\mathbf{a}|$), и плоскостей, перпендикулярных $\mathbf{b}$ (разделенных расстоянием $1/|\mathbf{b}|$). Б. Иллюстрация того, что векторы $\mathbf{c}^*$ и $\mathbf{c}$ не обязательно параллельны.

$$r = 1/(\mathbf{c} \cdot \mathbf{a} \times \mathbf{b}) \quad q = 1/(\mathbf{b} \cdot \mathbf{c} \times \mathbf{a}) \quad p = 1/(\mathbf{a} \cdot \mathbf{b} \times \mathbf{c}) \quad (13.76)$$

В соответствии со свойствами смешанного произведения трех векторов (см. Дополнение 8.2) каждое из этих чисел равно объему параллелепипеда, построенного на векторах $\mathbf{a}$, $\mathbf{b}$ и $\mathbf{c}$. Таким образом, $r = q = p = 1/V$, где V — объем элементарной ячейки кристалла. Пользуясь выражениями (13.74) — (13.76), можно построить ячейку обратной решетки, если известна элементарная ячейка кристалла. Два примера этого приведены на рис. 13.22.

На практике из геометрической картины распределения дифракционных пятен можно получить векторы обратной решетки $\mathbf{a}^*$, $\mathbf{b}^*$ и $\mathbf{c}^*$. Затем следует рассчитать векторы эле-

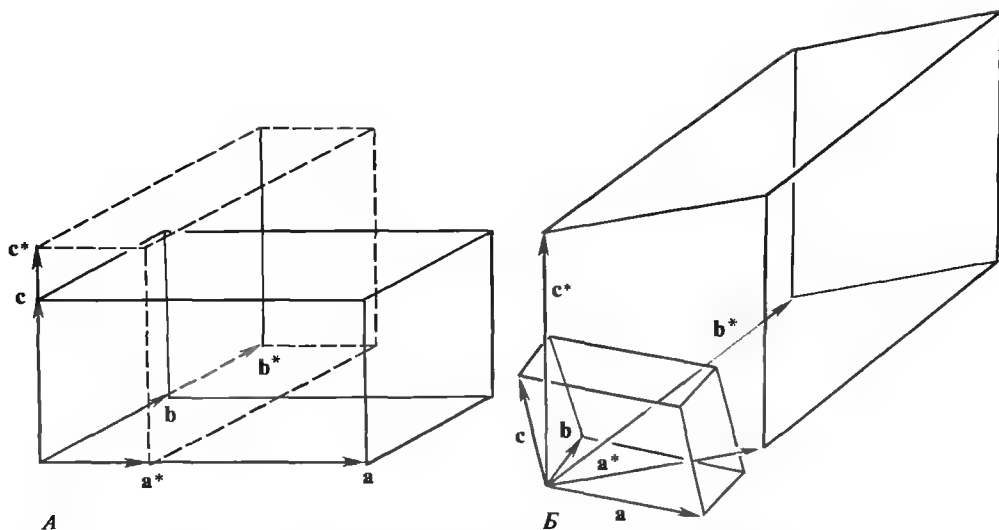


РИС. 13.22. Сравнение прямой и обратной элементарных ячеек. А. Случай ромбического кристалла. Б. Случай триклинного кристалла. (Stout G.H., Jensen L.M. X-Ray Structure Determination, New York, Macmillan, 1968.)

ментарной ячейки. Необходимые для этого действия подобны приведенным выше. Отметим, к примеру, что b^* и c^* лежат в плоскости, перпендикулярной a (см. рис.13.21). Поэтому $a = r' b^* \times c^*$; аналогичные выражения существуют для b и c . Для определения r' воспользуемся условием $a \cdot a^* = 1$. Тогда $r' = 1/(a^* \cdot b^* \times c^*) = 1/V^*$, где V^* — объем ячейки обратной решетки. Таким образом, элементарную ячейку можно построить по данным дифракционных измерений следующим образом:

$$a = (1/V^*)(b^* \times c^*) \quad (13.77a)$$

$$b = (1/V^*)(c^* \times a^*) \quad (13.77б)$$

$$c = (1/V^*)(a^* \times b^*) \quad (13.77в)$$

Из (13.74) и (13.77) с необходимостью следует, что объемы элементарных ячеек прямой и обратной решеток взаимно обратны (Guinier, 1963, с. 88):

$$V = 1/V^* \quad (13.78)$$

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ГРУППЫ

Кроме определения элементарной ячейки полезно установить пространственную группу кристалла. Пространственная группа показывает, имеется ли у кристалла какая-нибудь внутренняя симметрия и можно ли вследствие этой симметрии уменьшить элемент структуры, подлежащий определению. Общего способа установления пространственной группы нет, но для многих биологических молекул можно резко сузить набор возможных вариантов с помощью простого анализа интенсивностей в узлах обратной ре-

шетки. Для определенных кристаллических классов элементы симметрии в картине дифракции соответствуют элементам симметрии пространственной группы. Например, поворотная ось второго порядка в кристалле отвечает зеркальной плоскости в распределении интенсивностей в дифракционной картине.

Для множества пространственных групп еще более информативны систематические погасания интенсивности в определенных узлах обратной решетки. Рассмотрим пространственную группу с винтовой осью второго порядка вдоль $\mathbf{c}$. Эта ось обеспечивает переход x в $-x$, y в $-y$ и трансляцию на расстояние, равное половине размера ячейки вдоль $\mathbf{c}$. Тогда для каждого атома с радиусом-вектором $\mathbf{r} = x_j\mathbf{a} + y_j\mathbf{b} + z_j\mathbf{c}$ должен быть идентичный атом с радиусом-вектором $\mathbf{r}' = -x_j\mathbf{a} - y_j\mathbf{b} + (z_j + 1/2)\mathbf{c}$. При вычислении структурного фактора следует объединить идентичные атомы в пары. Из уравнения (13.70) имеем

$$F_m(h, k, l) = \sum_{j=1}^{N/2} f_j(S)(e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)} + e^{2\pi i(-hx_j - ky_j + lz_j + 1/2)}) \quad (13.79)$$

При $h = k = 0$ структурный фактор принимает вид

$$F_m(0, 0, l) = \sum_{j=1}^{N/2} f_j(S)[e^{2\pi ilz_j}(1 + e^{2\pi il/2})] \quad (13.80)$$

При любых нечетных l экспонента в круглых скобках становится равной -1 , и в результате исчезает всякое рассеяние. Таким образом, в частном случае, когда $h = 0, k = 0$ и l нечетно, не будет наблюдаться никакой дифракции. Иногда, если такие погасания недостаточны для однозначного определения пространственной группы, ее можно найти с помощью статистического анализа распределения интенсивностей в картине дифракции.

КРИСТАЛЛОГРАФИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ

Если известна решетка кристалла и пространственная группа симметрии, часто оказывается возможным определить молекулярную массу молекул, из которых состоит кристалл. Плотность кристалла ρ_c можно измерить экспериментально. Тогда масса W элементарной ячейки равна

$$W = \rho_c V \quad (13.81)$$

где V — объем элементарной ячейки, определенный по картине дифракции.

В общем случае можно считать, что в состав белковых или других макромолекулярных кристаллов входят три компонента: безводная макромолекула (m), свободный растворитель (s) и связанная вода (w). Масса элементарной ячейки будет суммой трех компонентов

$$\rho_c V = \rho_m V_m + \rho_w V_w + \rho_s V_s \quad (13.82)$$

где V относится к объему каждого компонента, а ρ — их плотность. Обычно величина ρ_s известна из эксперимента, а ρ_w можно принять равной плотности чистой воды.

Мы хотим рассчитать массу макромолекулярного компонента, приходящегося на ячейку, $\rho_m V_m$. Следовательно, из уравнения (13.82) следует исключить неизвестные величины V_w и V_s . Объем связанной воды можно записать через степень гидратации δ_1 , выражаемую в граммах воды на грамм макромолекул:

$$V_w = \delta_1 \rho_m V_m / \rho_w \quad (13.83)$$

Значения степени гидратации для белков и нуклеиновых кислот примерно известны (см. гл. 10). Суммарный объем элементарной ячейки равен

$$V = V_m + V_w + V_s \quad (13.84)$$

Используя (13.83), запишем объем свободного растворителя в виде

$$V_s = V - V_m(1 + \delta_1 \rho_m / \rho_w) \quad (13.85)$$

Подставляя (13.83) и (13.85) в (13.82) и решая получающееся уравнение относительно $\rho_m V_m$, имеем

$$W_m = \rho_m V_m = \frac{V(\rho_s - \rho_s)}{1 - \rho_s / \rho_m + \delta_1(1 - \rho_s / \rho_w)} \quad (13.86)$$

Таким образом, можно вычислить массу макромолекулы, приходящуюся на элементарную ячейку, если известна плотность безводной макромолекулы ρ_m . Обычно в хорошем приближении можно приравнять ρ_m^{-1} удельному парциальному объему $\bar{V}_m$, измеренному для макромолекулы в растворе.

Если на элементарную ячейку приходится одна макромолекула, то молекулярная масса есть $M = N_0 W_m$, где N_0 — число Авогадро. Если же пространственная группа указывает, что в элементарной ячейке содержится n' асимметричных единиц, то молекулярная масса одной асимметричной единицы равна

$$M = N_0 W_m / n' \quad (13.87)$$

Другие методы определения молекулярной массы молекул в кристалле обсуждаются Мэтьюзом (Matthews B.W., 1975).

Часто оценка молекулярной массы уже известна из гидродинамических измерений или из данных о первичной структуре. В таком случае по измерениям массы W_m можно найти n' , которое всегда должно быть целым числом. Вместе с тем если известна оценка величины n' , ее можно использовать для уточнения значения молекулярной массы.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ГРУППЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИНФОРМАЦИИ О СИММЕТРИИ МАКРОМОЛЕКУЛЫ

В большинстве случаев число молекул в элементарной ячейке n равняется числу асимметричных единиц n' . Здесь мы рассмотрим частный случай макромолекулы, представляющей собой олигомер, состоящий из идентичных субъединиц. Например, молекула с пятью субъединицами могла бы иметь симметрию C_5 . Но эта симметрия никогда не будет соответствовать элементу симметрии пространственной группы, поскольку не существует пространственной группы с поворотной осью C_5 . Следовательно, в состав асимметричной единицы должны входить все пять субъединиц.

С другой стороны, во многих случаях молекула с поворотной симметрией C_2 или C_3 кристаллизуется так, что ее ось является также осью симметрии мотива. В таком случае число асимметричных единиц в элементарной ячейке может определяться числом субъединиц в ячейке, а не просто числом молекул. Это позволяет сделать заключение о наличии у макромолекулы поворотной оси симметрии. Заметим, однако, что вовсе не обязательно, чтобы все поворотные оси симметрии молекулы были бы одновременно и поворотными осями симметрии кристалла. Поэтому подобная оценка симметрии — это минимальная оценка.

В качестве примера рассмотрим аспартат-транскарбамоилазу, с которой мы уже встре-

чались в гл. 2. В одной кристаллической модификации этот фермент кристаллизуется так, что получается пространственная группа с восемью асимметричными единицами на элементарную ячейку, но при этом в ячейке содержится всего четыре молекулы. Это указывает на наличие поворотной оси симметрии второго порядка. В другой кристаллической модификации пространственная группа такова, что на ячейку приходится шесть асимметричных единиц, но ее размеры позволяют вместить только две молекулы. Таким образом, в молекуле существует поворотная ось симметрии третьего порядка. Поскольку каждая субъединица должна быть асимметричной, обе эти оси могут существовать одновременно лишь при условии, что в молекуле имеется шесть (или целое кратное шести) субъединиц каждого типа. Аспартат-транскарбамоилаза имеет субъединичную структуру C_6T_6 , модель ее симметричной организации показана на рис. 2.49.

ИЗМЕНЕНИЕ ГЕОМЕТРИИ РАССЕЯНИЯ ПРИ ДИФРАКЦИОННЫХ ИЗМЕРЕНИЯХ

Узлы обратной решетки располагаются в точках пространства, точно определяемых условиями Лауэ. Во всех случаях, когда кристалл и падающий пучок ($\hat{S}_0$) ориентированы так, что вектор рассеяния $\mathbf{S}$ попадает в узел обратной решетки, вдоль вектора $\hat{S} = \lambda \mathbf{S} + \hat{S}_0$ наблюдается дифрагировавшее излучение. Выполняя измерения, мы можем по своему усмотрению изменять ориентацию кристалла, детектора или падающего пучка. Обычно изменяют ориентацию кристалла. При фиксированной ориентации кристалла обратная решетка также фиксирована в пространстве. Если кристалл поворачивают на некоторый угол вокруг выбранной оси, обратная решетка поворачивается на такой же угол вокруг той же лабораторной оси.

При заданных длине волны излучения, ориентациях кристалла и падающего пучка рентгеновских лучей все возможные векторы рассеяния простираются от начала координат до поверхности сферы отражения (рис. 13.23). Эту сферу можно построить с помощью рис. 13.3,А, рассмотрев все возможные ориентации вектора $\mathbf{S}$. Ее диаметр равняется $2/\lambda$, поскольку это наибольшее из возможных значений $|\mathbf{S}|$, соответствующее $\theta = 90^\circ$. Поверхность сферы проходит через начало обратной решетки. Здесь $h = k = l = 0$, вектор рассеяния $\mathbf{S}$ имеет нулевую длину и $\theta = 0^\circ$, т.е. все излучение рассеивается просто вперед, в направлении падающего пучка.

Сфера отражения будет охватывать целый ряд узлов обратной решетки. Однако дифракция будет наблюдаться только тогда, когда эти узлы располагаются на поверхности сферы. Очевидно, что если обратная решетка буквально состоит из точек, то вероятность появления дифракции бесконечно мала. К счастью, в действительности используемое в дифракционных экспериментах излучение представляет собой некоторый непрерывный набор длин волн. Это означает, что «работает» не просто поверхность сферы, но некоторый объем со сферической конфигурацией. Более того, реальный кристалл состоит из множества кристаллических зои, или блоков, со слегка различающимися ориентациями. Этот эффект, называемый мозаичностью, означает, что узлы обратной решетки на самом деле превращаются в области конечных размеров. Тем не менее одновременно пересекает поверхность сферы отражения будет лишь немного узлов решетки (рис. 13.23,А).

Чтобы получить достаточное количество дифракционных данных, необходимых для определения структуры кристалла, следует измерить направления и интенсивности как можно большего числа дифрагировавших лучей. Поэтому на опыте всегда вращают или колеблют кристалл неким определенным образом. Это приводит к тому, что сфера отражения последовательно пересекается многими узлами обратной решетки, и можно соответственно произвести большое количество измерений (рис. 13.24). Заметим, что именно дискретный характер обратной решетки затрудняет получение дифракционных данных в

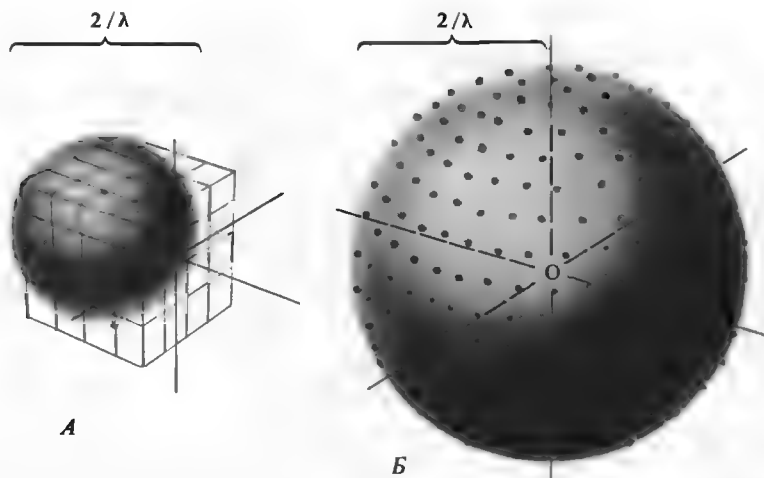


РИС. 13.23. Экспериментальные ограничения при наблюдении рентгеновской дифракции. *А.* При фиксированных геометрии опыта и длине волны излучения рассеяние будет наблюдаться только тогда, когда узлы обратной решетки окажутся на поверхности сферы отражения. *Б.* Даже если перебрать все возможные геометрии, можно исследовать лишь ту часть обратной решетки, которая попадает внутрь сферы радиуса $2/\lambda$ (сферы ограничения).

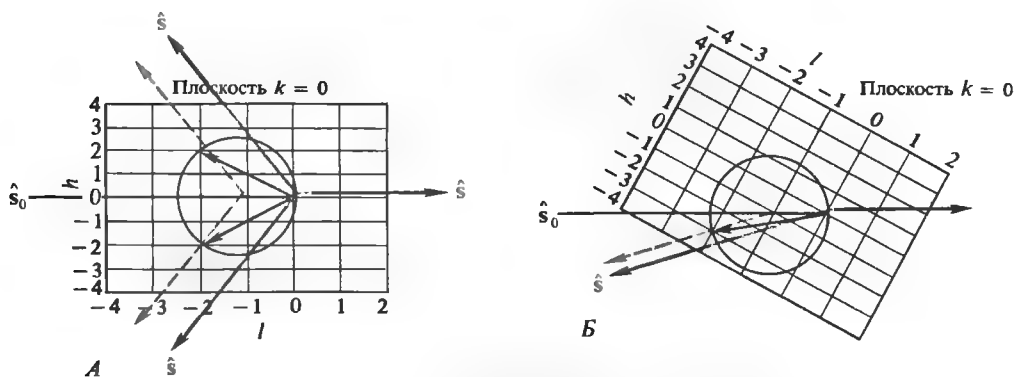


РИС. 13.24. Влияние вращения образца на наблюдаемую дифракцию. *А.* Ориентация образца, при которой пара векторов рассеяния (черные стрелки) оканчивается в узлах обратной решетки. Заметим, что если считать рассеянное излучение (коричневые стрелки) выходящим из центра сферы отражения, то векторы $\hat{\mathbf{S}}$ проходят через те точки обратной решетки, в которых оканчиваются векторы $\hat{\mathbf{S}}$. *Б.* Иная геометрия, при которой «светится» лишь один узел обратной решетки.

случае трехмерного кристалла. Если мы имеем двумерный объект, то его обратной решеткой является набор прямых (см. рис. 13.12). Многие из них пересекают сферу отражения сразу в двух точках, так что уже при одной геометрии опыта можно получить много дифракционных пятен (см. рис. 13.11).

НЕКОТОРЫЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ДИФРАКЦИОННЫХ ДАННЫХ

Картина пространственного распределения дифрагировавших лучей, получающаяся при вращении кристалла, совсем не обязательно будет простой. Однако правильный выбор осей вращения может давать достаточно регулярные картины расположения дифракционных пятен. Предположим, например, что падающий пучок перпендикулярен оси $\mathbf{b}$ и кристалл поворачивается вокруг этой же оси. В камере вращения образец окружен цилиндрической пленкой (рис. 13.25, А). При этом все дифрагировавшие лучи, соответствующие выбранному уровню k обратной решетки (скажем, $h, 0, l$), будут попадать на пленке на одну и ту же линию. Однако при каком-то одном положении кристалла порядок расположения пятен, зависящий от h и l , не будет регулярным и дифракционная картина будет достаточно бедной. При вращении же кристалла на эту линию попадает весь k -слой обратной решетки. Типичный пример этого представлен на рис. 13.25, Б.

Очевидно, хотелось бы иметь способ получения дифракционных данных, при котором как можно лучше учитывается пространственная организация обратной решетки. Этого можно достичь, например, пользуясь прецессионной камерой, в которой образец и пленка вращаются таким образом, что дифракционные пятна от всех отдельных линий обратной решетки образуют соответствующим образом расположенные линии на пленке. Детали принципа работы прецессионной камеры довольно сложны, и читатель может познакомиться с ними в соответствующей литературе. Здесь же мы скажем только, что результатом съемки с этой камерой являются рентгенограммы, на каждой из которых представ-

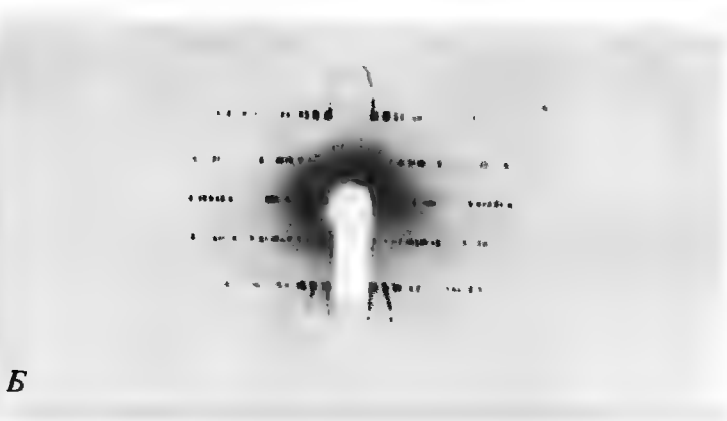
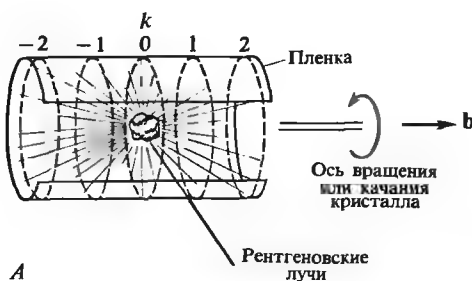


РИС. 13.25. Камера вращения. При помощи этой камеры плоскость обратной решетки проецируется в линию на пленке. А. Схематическое представление камеры вращения. Б. Пример рентгенограммы вращения. (Stout G.H., Jensen L.M. X-Ray Structure Determination, New York, Macmillan, 1968.)

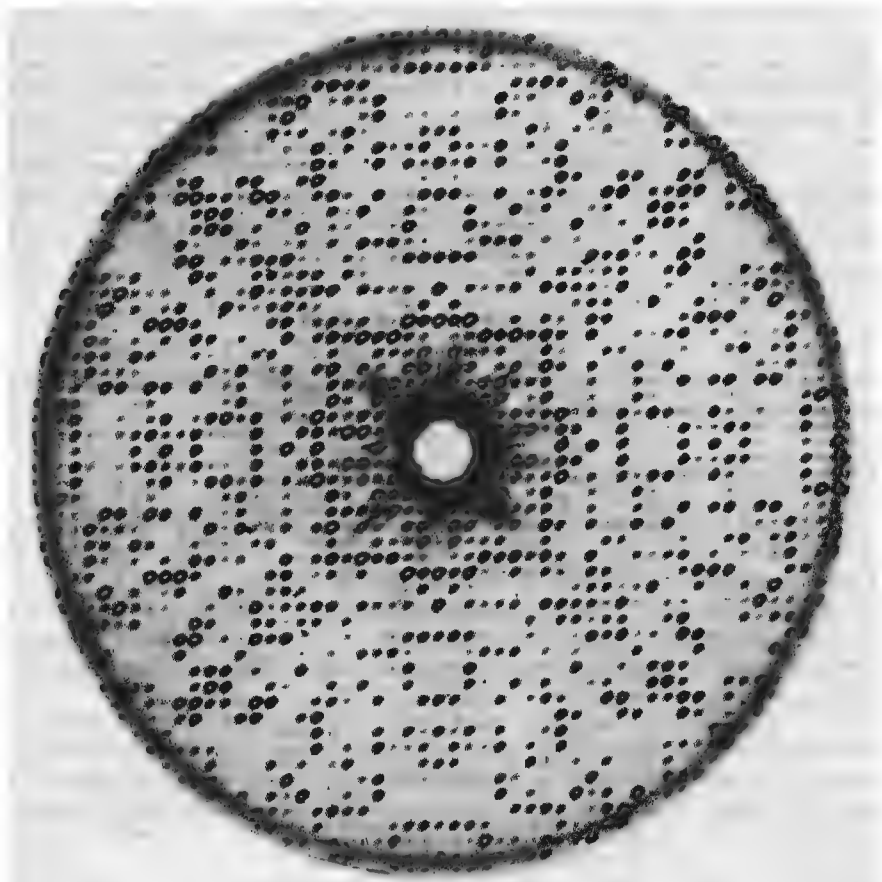


РИС. 13.26. Прецессионная рентгенограмма. Без каких-либо искажений представлена целая плоскость обратной решетки. Объектом исследования служил тетрагональный кристалл лизозима. Отметим наличие в картине дифракции поворотной оси четвертого порядка и нескольких плоскостей зеркальной симметрии (C.C.F. Blake).

лена одна плоскость обратного пространства. Набор таких рентгенограмм позволяет получить всю доступную информацию о картине дифракции. На рис. 13.26 приведен пример прецессионной рентгенограммы. Для перевода рентгеновской фотографии в набор интегральных интенсивностей рассеяния с соответствующими им индексами (h, k, l) используются денситометры с двумерным сканированием, измеряющие почернение фотопленки.

Альтернативой прецессионной камере служит автоматический дифрактометр, получивший в настоящее время гораздо более широкое распространение. Если известны кристаллический класс и элементарная ячейка объекта исследования, можно определить его абсолютную ориентацию в пространстве. В таком случае можно предсказать геометрию образца и детектора, при которой должно появляться пятно с заданными индексами h, k, l . Эта информация передается компьютеру, который находит данное пятно, управляет измерением его интенсивности, поворачивает образец и детектор в положение, необходи-

РИС. 13.27. Карты электронной плотности при различном разрешении. *А.* Две цепи антипараллельного β -слоя поли-L-аланина в двумерной элементарной ячейке. Показаны оси симметрии C_2 и 2_1 плоской проекции структуры. *Б.* Данные о структурном факторе, рассчитанные для двумерного кристалла, образованного проекцией структуры на плоскость $a - b$. Последовательно увеличивающиеся круги ограничивают набор используемых данных при разрешениях, равных соответственно 4, 2 и 1 Å. Черные кружки соответствуют $F(h, k) > 0$, светлые кружки $F(h, k) < 0$. Размер каждого кружка пропорционален $|F(h, k)|$. *В.* Карта электронной плотности, рассчитанная по данным фрагмента *Б* при разрешении 4 Å. *Г.* Карта электронной плотности, рассчитанная по данным того же фрагмента при разрешении 2 Å. *Д.* Карта электронной плотности, рассчитанная по данным того же фрагмента при разрешении 1 Å. (Fraser R.D.B., McRae T.P. In: Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry, part A, ed. S.J. Leach, New York, Academic Press, 1969).

мое для нахождения следующего пятна, и т. д. Интенсивность может измеряться прямо твердотельными сцинтилляционными детекторами.

СФЕРА ОГРАНИЧЕНИЯ

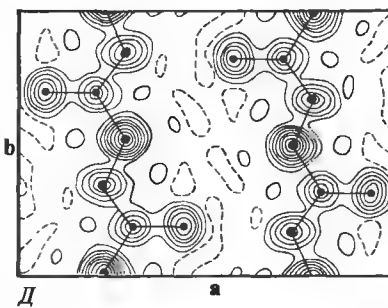
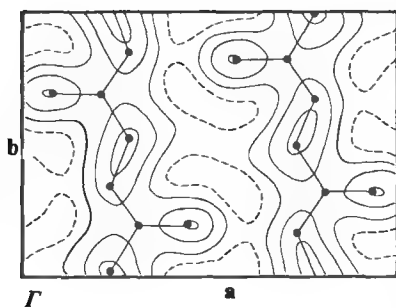
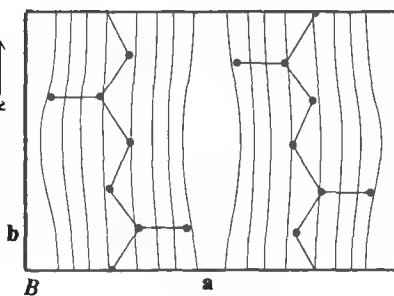
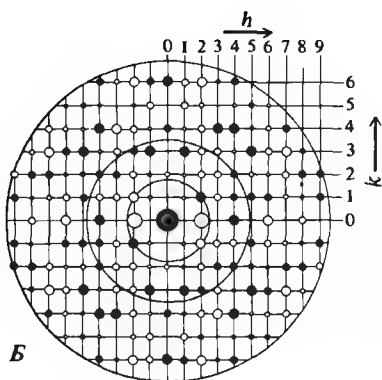
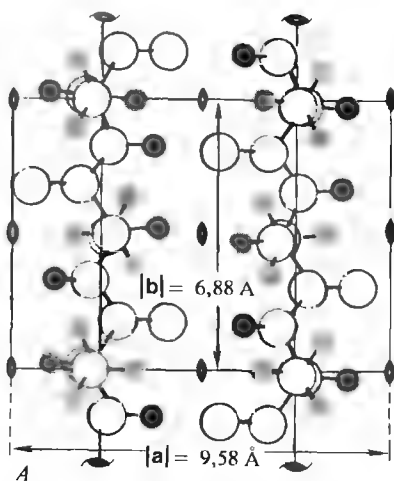
Обратная решетка в принципе бесконечна. Каждый из индексов h, k, l меняется от $-\infty$ до $+\infty$. Обратное преобразование Фурье, необходимое для расчета электронной плотности по рентгеновским структурным факторам, выражается бесконечной суммой по всем трем индексам [уравнение (13.39)]. Но практически нельзя получить данные по всей бесконечной обратной решетке. Более существенно здесь то, что это невозможно и в принципе, ибо конечная длина волны излучения ограничивает наибольшие значения индексов h, k, l , для которых существует дифракционная интенсивность.

Вернемся к рис. 13.23, *А* и обратим внимание на положение сферы отражения: Путем вращения кристалла вокруг любой из трех осей лабораторной системы координат можно «заставить» узлы обратной решетки пересекать поверхность сферы отражения, но за пределами досягаемости останется множество узлов, которые расположены дальше от начала координат, чем самая далекая точка поверхности этой сферы. Наибольшая длина, которую может иметь вектор рассеяния, равняется $2/\lambda$. Таким образом, при всех возможных геометриях мы не получим информации от точек обратного пространства, отстоящих от начала координат больше чем на $2/\lambda$.

Этим ограничением определяется сфера радиуса $2/\lambda$ с центром в начале координат (см. рис. 13.23, *Б*). Диаметр ее ровно в два раза больше диаметра сферы отражения. Она называется сферой ограничения. Всеми узлами обратной решетки, находящимися в пределах сферы ограничения, можно воспользоваться для измерений при соответствующем выборе геометрии эксперимента. Но все точки вне этой сферы недоступны для измерений. Единственный выход здесь состоит в том, чтобы уменьшить длину волны излучения, увеличив тем самым диаметр сферы ограничения.

ОГРАНИЧЕННОСТЬ РАЗРЕШЕНИЯ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ СТРУКТУРЫ ПО ДАННЫМ ДИФРАКЦИИ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ

К чему же приводит наша неспособность измерять рассеяние по всему обратному пространству? Большим расстояниям в обратном пространстве соответствуют меньшие расстояния внутри реальной кристаллической решетки. Поэтому с ограничением набора дифракционных данных исчезает возможность различать сколь угодно мелкие детали в распределении электронной плотности. Короче говоря, уменьшается разрешение, с которым можно определить структуру кристалла. Это утверждение полезно рассмотреть количественно.



Какую часть данных внутри сферы ограничения нужно получить, чтобы обеспечить определение структуры с данным разрешением? Вектор $\mathbf{S}$ обратного пространства есть $h\mathbf{a}^* + k\mathbf{b}^* + l\mathbf{c}^*$, длина его — $|\mathbf{S}|$, размерность — $\text{\AA}^{-1}$. Следовательно, $|\mathbf{S}|$ соответствует реальному расстоянию $d = 1/|\mathbf{S}|$. Можно оценить ¹⁾, что все дифракционные данные, собранные до значения $|\mathbf{S}|$, содержат информацию, необходимую для определения структуры с разрешением около $1/|\mathbf{S}| \text{\AA}$.

Смысл ограниченности разрешения лучше всего виден на чисто теоретическом примере. На рис. 13.27,А показан фрагмент β -слоя. Для простоты будем рассматривать его спроецированным на плоскость $\mathbf{a} - \mathbf{b}$. (Обсуждение того, как проекция осуществляется математически, излагается в Дополнении 13.5.) Повторением элементарной ячейки, изображенной на рис. 13.27,А, создается бесконечная двумерная решетка. Структурный фактор, обусловленный рентгеновским рассеянием от такой решетки, можно точно вычислить при помощи двумерного аналога уравнения (13.70):

$$F_m(h, k) = \sum_j f_j(S) e^{2\pi i(hx_j + ky_j)} \quad (13.88)$$

Индексы h и k могут принимать любые выбранные нами целые значения от $-\infty$ до $+\infty$.

На рис. 13.27,Б приведена часть получающегося набора данных о структурных факторах. Заметим, что здесь указаны как фаза, так и амплитуда структурного фактора. Поскольку двумерная проекция двухцепочечного β -слоя обладает центром симметрии, структурный фактор — действительная, а не мнимая величина, и фазовый член сводится просто к знаку «+» или «-», как было отмечено ранее в данной главе.

Для набора рентгеновских данных, представленного на рис. 13.27,Б, мы можем рассчитать структуру, которая его породила, воспользовавшись уравнением (13.39). Для двух измерений имеем

$$\rho(x, y) = (1/A) \sum_{h=-\alpha}^{\alpha} \sum_{k=-\alpha}^{\alpha} F_m(h, k) e^{-2\pi i(hx + ky)} \quad (13.89)$$

где A — площадь элементарной ячейки. Однако на практике нельзя определить $F_m(h, k)$ для всех h и k от $-\infty$ до $+\infty$. Предположим, мы смогли провести измерения лишь для $|\mathbf{S}|$, не превышающего $1/4 \text{\AA}^{-1}$. Это ограничивает величины h и k значениями, попадающими внутрь круга радиусом $|\mathbf{S}| = |h\mathbf{a}^* + k\mathbf{b}^*|$ с центром в начале координат. (На рис. 13.27,Б это внутренний круг.) h и k здесь ограничены значениями $-1, 0$ и 1 . Если в уравнении (13.89) используются только эти значения, то получается образ структуры с разрешением около $4 \text{\AA}$. Такой результат (см. рис. 13.27,В) позволяет увидеть лишь два пептидных тяжа, но не дает никаких деталей молекулярной структуры.

Расширяя набор используемых данных до больших значений $|\mathbf{S}|$, мы получим изображения структуры с более высоким разрешением. Заметим, что в этих изображениях присутствуют области отрицательной электронной плотности (контуры, показанные пунктиром). Это происходит потому, что набор данных все еще ограничен. Идеальное изображение структуры получается только тогда, когда мы располагаем бесконечным набором данных. Поскольку практически такой набор получить нельзя, используются необходимые поправки, с тем чтобы компенсировать обрыв ряда в уравнении (13.89).

¹⁾ Из теории формирования изображений следует, что, если зарегистрированы все рассеянные волны с длинами $d \text{\AA}$ или больше, можно разрешить детали структуры, разделенные расстоянием, большим или равным $0,6d \text{\AA}$. В действительности рентгеновские данные несовершенны, и более реалистической оценкой будет $d \text{\AA}$.

Дополнение 13.5

ПРОЕКЦИИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЭЛЕКТРОННОЙ ПЛОТНОСТИ

Часто бывает удобнее работать не с трехмерным распределением электронной плотности, а с его проекцией на плоскость. Выберем плоскость, перпендикулярную произвольному направлению $\mathbf{q}$. Любой вектор $\mathbf{r}$, проведенный в данную точку кристалла, можно представить в виде суммы компоненты вдоль $\mathbf{q}$ и компоненты $\mathbf{d}$, перпендикулярной $\mathbf{q}$:

$$\mathbf{r} = \mathbf{d} + q\hat{\mathbf{q}}$$

где $\hat{\mathbf{q}}$ — единичный вектор, а q — величина проекции на направление $\mathbf{q}$. Распределение электронной плотности в кристалле дается выражением

$$\rho(\mathbf{r}) = \int_{-\infty}^{\infty} dS F(\mathbf{S}) e^{-2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} = \int_{-\infty}^{\infty} dS F(\mathbf{S}) e^{-2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{d}} e^{-2\pi i q \mathbf{S} \cdot \hat{\mathbf{q}}}$$

Его проекция на плоскость, перпендикулярную $\mathbf{q}$, есть просто интеграл $\rho(\mathbf{r})$ по всем q :

$$\rho_q(\mathbf{d}) = \int_{-\infty}^{\infty} dq \int_{-\infty}^{\infty} dS F(\mathbf{S}) e^{-2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{d}} e^{-2\pi i q \mathbf{S} \cdot \hat{\mathbf{q}}} = \int_{-\infty}^{\infty} dS F(\mathbf{S}) e^{-2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{d}} \int_{-\infty}^{\infty} dq e^{-2\pi i q \mathbf{S} \cdot \hat{\mathbf{q}}}$$

Второй интеграл есть не что иное, как дельта-функция Дирака $\delta(\mathbf{S} \cdot \hat{\mathbf{q}})$. Поэтому он обращается в нуль, если не выполняется условие $\mathbf{S} \cdot \hat{\mathbf{q}} = 0$, иначе говоря, если $\mathbf{S}$ не лежит в плоскости, перпендикулярной $\hat{\mathbf{q}}$, где второй интеграл есть единица. Таким образом, если $\mathbf{S}_q$ представляет собой все векторы рассеяния, перпендикулярные $\hat{\mathbf{q}}$, то

$$\rho_q(\mathbf{d}) = \int_{-\infty}^{\infty} dS_q F(\mathbf{S}_q) e^{-2\pi i \mathbf{S}_q \cdot \mathbf{d}} \quad (\text{А})$$

Интеграл проекции берется только по плоскости обратного пространства, проходящей через его начало координат и перпендикулярной оси проекции. Если выполнить обратное фурье-преобразование, получим

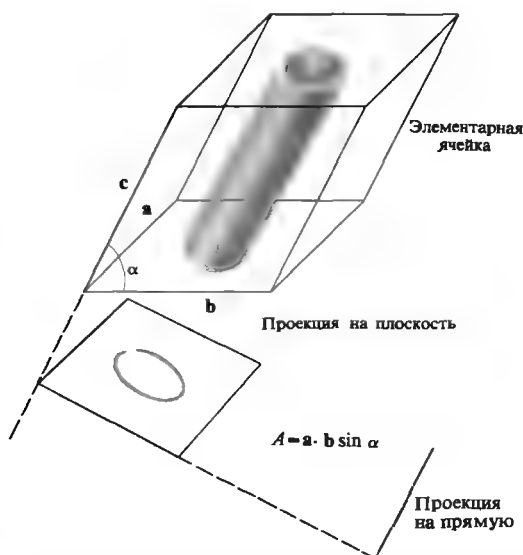
$$F(\mathbf{S}_q) = \int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{d} \rho_q(\mathbf{d}) e^{2\pi i \mathbf{S}_q \cdot \mathbf{d}} \quad (\text{Б})$$

Уравнения (А) и (Б) очень полезны. Они означают, что если измерять рентгеновское рассеяние в плоскости обратного пространства $F(\mathbf{S}_q)$, то можно рассчитать электронную плотность проекции структуры на ту же плоскость. И обратно, любая плоскость, проходящая через начало координат обратного пространства, будет содержать информацию только об электронной плотности молекулы, спроецированной на эту плоскость. Обычно выбирают проекции вдоль кристаллических осей. Пусть, например, $\mathbf{q}$ — ось $\mathbf{c}$ кристалла. Тогда, после введения условий Лауэ, уравнение (А) принимает вид

$$\rho(x, y) = (1/A) \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} F(h, k, 0) e^{-2\pi i (hx + ky)}$$

Отметим, что это проекция электронной плотности на плоскость, перпендикулярную оси $\mathbf{c}$. Эта плоскость не обязательно совпадает с плоскостью $\mathbf{a}-\mathbf{b}$, если только симметрия кристалла не такова, что $\mathbf{a}$ и $\mathbf{b}$ перпендикулярны $\mathbf{c}$. A есть площадь проекции грани $\mathbf{a}-\mathbf{b}$ элементарной ячейки, перпендикулярной оси $\mathbf{c}$, как показано на рисунке.

В случае многих молекул правильно выбранные проекции могут обладать симметрией, не присущей структуре как целому. Исследование рентгеновской дифракции, соответствующей таким проекциям, часто помогает упростить определение структуры. Когда кристаллографы показывают рентгенограммы, они по сути дела всегда демонстрируют данные для какой-то одной плоскости обратной решетки. Обычно это плоскость, для которой индекс одного из направлений в обратной решетке равен нулю, т.е. $h, k, 0$, $h, 0, l$ или $0, k, l$.



Проекция распределения электронной плотности. Элементарная ячейка содержит молекулу в виде полого цилиндра. Молекула проецируется в пустой эллипс на плоскость, перпендикулярную c . Этот эллипс можно затем спроецировать на прямую.

Подобным же образом лежащий на одной прямой ряд узлов обратной решетки будет содержать данные, необходимые для вычисления проекции электронной плотности на соответствующую прямую. Эта прямая будет пересечением плоскостей, перпендикулярных двум направлениям проецирования, как показано на рисунке. Например, если a , b и c взаимно перпендикулярны, нулевая слоевая линия $(h, 0, 0)$ описывает проекцию электронной плотности на ось a .

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ОГРАНИЧЕНИЯ РАЗРЕШЕНИЯ

Приведенный пример иллюстрирует ограничения в определении структуры, которые существуют даже при наличии совершенных дифракционных данных. На опыте же длина волны используемого излучения ограничивает доступную область обратной решетки значениями $|S| \leq 2/\lambda$.

Естествен вопрос: почему бы всякий раз не пользоваться набором данных, достаточным для определения структуры с максимальным разрешением, возможным для данной сферы ограничения? На этот счет имеются три практических соображения. Каждый кристалл всегда в какой-то мере неупорядочен, так что рентгеновские данные, соответствующие малым расстояниям в кристалле, могут просто отсутствовать. Объем вычислений, необходимых для расчета структуры, быстро растет с ростом числа экспериментальных точек. Число же дифракционных пятен, равное числу узлов обратной решетки, содержащихся внутри сферы с радиусом $|S|$, растет пропорционально объему этой сферы.

Число узлов обратной решетки внутри сферы радиуса $|S|$ примерно равно числу n ячеек обратной решетки, содержащихся внутри этой сферы. Если V^* — объем одной ячейки обратной решетки, а $(4/3)\pi |S|^3$ — объем сферы, то

$$n = (4/3)\pi |S|^3 / V^* = V(4/3)\pi / d^3 \quad (13.90)$$

где V — объем элементарной ячейки прямой решетки, а $d = |S|^{-1}$ — разрешение. Поэтому число дифракционных пятен, которые подлежат измерению, увеличивается как куб желаемого разрешения.

Два фактора снижают минимальное число дифракционных пятен, или узлов обратной решетки, необходимых для получения всей структурной информации при данном разрешении. Как показано в уравнении (13.18), из действительности электронной плотности вытекает, что картина дифракции обладает центром симметрии, т.е. $F(h, k, l) = F^*(-h, -k, -l)$ (звездочкой обозначена комплексно-сопряженная величина). Таким образом, для измерений нужна лишь половина сферы ограничения. Далее, для большинства кристаллических классов характерна дополнительная симметрия картины дифракции в обратном пространстве (см. табл. 13.1)

Тетрагональный кристалл будет иметь поворотную ось четвертого порядка. Дифракционная картина от такого кристалла полностью определяется лишь одним октантом обратного пространства. Рассмотрим кристалл цитохрома *c*, принадлежащий к тетрагональному классу. Размеры элементарной ячейки этого кристалла $a = b = 58,5 \text{ \AA}$ и $c = 42,3 \text{ \AA}$. Объем элементарной ячейки $abc = 144\,700 \text{ \AA}^3$. Из уравнения (13.90) следует, что для сферы ограничения, достаточной для определения структуры с разрешением $d \text{ \AA}$, число содержащихся в ней отражений $n = 606\,400/d^3$. Поскольку кристалл принадлежит к тетрагональному классу, число неэквивалентных дифракционных отражений составляет всего 1/8 от общего их числа, т.е. $75\,800/d^3$. Практически это означает, что для разрешения $4 \text{ \AA}$ надо измерить примерно 1200 пятен. При разрешении $2 \text{ \AA}$ это число увеличивает-ся до 9500, а при разрешении $1 \text{ \AA}$ — до 75 800. Очевидно, что в случае больших элементарных ячеек, существующих в макромолекулярных кристаллах, объем работы, необходимой для улучшения разрешения, может принимать устрашающие размеры.

13.4. Определение структуры молекул методом рентгеновской кристаллографии

ФАЗОВАЯ ПРОБЛЕМА

Мы показали, что по измерениям дифракционной картины относительно легко определить свойства кристаллической решетки. Однако главная проблема рентгеновской кристаллографии — отыскание $\rho(\mathbf{r})$ — распределения электронной плотности внутри элементарной ячейки. В принципе мы решили эту проблему с помощью уравнения (13.39)

$$\rho(x, y, z) = (1/NV) \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} F(h, k, l) e^{-2\pi i(hx + ky + lz)}$$

Однако здесь существует огромное практическое затруднение. Как уже упоминалось [уравнение (13.12)], каждый структурный фактор $F(h, k, l)$ представляет собой комплексную величину $|F|e^{i\phi}$, состоящую из амплитуды $|F|$ и фазового члена $e^{i\phi}$. В эксперименте можно измерить только квадрат амплитуды $|F|^2$. Фазовый угол ϕ может иметь любое значение от 0 до 2π .

В особом случае, когда в кристалле имеется центр симметрии, возможные значения фазы существенно ограничены. Для такого кристалла $\rho(\mathbf{r}) = \rho(-\mathbf{r})$. Как было показано раньше, в этом случае $F(h, k, l)$ — действительная величина; фаза может равняться либо 0, либо π , а $e^{i\phi}$ — соответственно ± 1 . Это означает, что в фурье-синтезе электронной плотности неизвестен лишь знак каждого из членов. Однако даже в этих случаях для набора из n дифракционных пятен существует 2^n возможных значений фаз.

При работе с биологическими объектами невозможность экспериментального измерения фаз представляет действительно серьезную проблему. Дело здесь не только в том,

что велико число дифракционных пятен, но и в том, что кристаллы биологических молекул не могут иметь центров симметрии, поскольку они содержат асимметричные углеродные атомы. Определенные приемы, которые мы опишем ниже, помогут в получении частичной информации о фазе. Иногда при решении задач установления структуры необходимо привлекать данные о химии молекулы или другую заранее известную информацию. Всех этих методов обычно хватает для оценки фаз с той точностью, которая необходима для расчета трехмерной структуры. Но надо помнить о том, что при использовании описываемых ниже методов иногда может получаться неправильная структура.

ФАЗЫ ВАЖНЕЕ, ЧЕМ АМПЛИТУДЫ

Поскольку мы измеряем амплитуды, но не фазы, интересно выяснить, какой из этих двух параметров важнее при установлении правильной структуры. На этот вопрос можно ответить, беря известную структуру и рассчитывая для нее правильные структурные факторы $|F|e^{i\phi}$. Если подставить найденные величины обратно в уравнение (13.90), то, разумеется, мы должны получить точную картину распределения электронной плотности. Это иллюстрируется рис. 13.27, Д, где показана двумерная проекция фрагмента β -слоя.

Предположим вместо этого, что используются все правильные значения амплитуды, но каждой фазе произвольно приписывается одно и то же значение 0° . Картина, получающаяся в результате фурье-синтеза (рис. 13.28, А), ничем не напоминает β -слой. Далее, предположим, что все амплитуды имеют одно и то же значение $|F| = \pm (\sum |F_k|^2)^{1/2}$, где просуммированы квадраты всех амплитуд в картине дифракции. Это соответствует среднему по всем значениям измеренной интенсивности. Если объединить их с правильными значениями фазы, то картина, получающаяся в результате фурье-синтеза (рис. 13.28, Б), безусловно будет похожа на β -слой. Таким образом, мы встречаемся с неблагоприятной ситуацией, когда величины, недоступные измерению, оказываются в действительности более важными, чем те, которые можно получить в эксперименте.

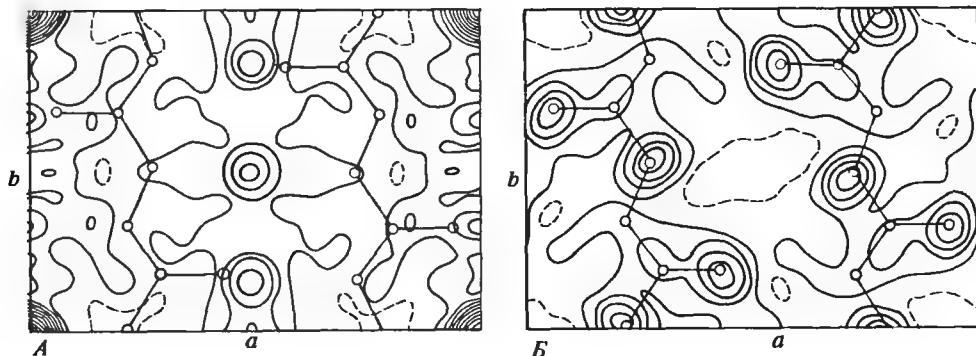


РИС. 13.28. Относительная значимость интенсивностей и фаз при расчете карты электронной плотности по данным дифракции. Объект и данные те же, что и на рис. 13.27. А. Для фурье-синтеза использовались правильные значения амплитуд, но все фазы считались равными нулю. Б. В фурье-синтезе участвовали правильные фазы, но все амплитуды считались равными одному и тому же среднему значению. (Fraser R.D.B., MacRae T.P. In: *Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry*, part A, ed. S.J. Leach, New York, Academic Press, 1969.).

ОБЩИЕ СООБРАЖЕНИЯ ОТНОСИТЕЛЬНО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ

У задачи определения, или решения, структуры огромное число неизвестных: положение каждого атома в элементарной ячейке, тип атома и, следовательно, ожидаемый атомный фактор рассеяния и, наконец, фаза, связанная с каждым дифракционным пятном. Но есть также и значительное количество доступных данных: интенсивности дифракции, пространственная группа, элементарная ячейка кристалла и обычно значительная информация об исследуемой молекуле (например, частичная или полная химическая структура и, возможно, даже некоторые конформационные данные).

Самая общая цель — найти такую структуру молекулы, которая наилучшим образом согласуется с полученными дифракционными данными и не противоречит (без должных на то оснований) нашей химической интуиции и имеющемуся набору структурных данных. При такой постановке вопроса становится очевидным, что метод дифракции рентгеновских лучей практически не является абсолютным при определении структуры. В случае большинства макромолекулярных структур необходимо использовать кроме чисто дифракционных данных и другую информацию. Иными словами, для того, чтобы однозначно установить положение и тип каждого атома в структуре, недостаточно одних только рентгеновских данных. Даже если бы можно было экспериментально измерить все фазы структурных факторов, информации могло бы не хватить. Остается лишь удивляться смелости первых ученых, взявшихся за расшифровку структур макромолекулярных кристаллов.

ЭТАПЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТРУКТУРЫ МАЛОЙ МОЛЕКУЛЫ

Здесь мы опишем несколько приемов, используемых при определении структуры малой молекулы. Это не обязательно самые эффективные методы, которые применяются в настоящее время, но они послужат полезному сравнению с методами расшифровки структуры больших молекул, которые мы изложим позже.

1. Сначала пытаются получить подходящие кристаллы, а затем определяют пространственную группу, элементарную ячейку и получают набор данных об амплитудах $|F_{\text{эксп}}(h, k, l)|$.

2. Предпринимают попытку найти положение нескольких атомов. Это можно сделать с помощью прямых методов (Blundell, Johnson, 1976¹⁾) либо путем поиска в структуре нескольких тяжелых атомов с использованием функции Паттерсона, обсуждаемой ниже.

3. Если известно положение нескольких атомов, можно рассчитать с помощью уравнения (13.70) вклад F_H , вносимый ими в рассеяние:

$$F_H(h, k, l) = \sum_j f_j(s) e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)} \quad (13.91)$$

где индекс j относится ко всем атомам с известным положением. Заметим, однако, что наблюдаемый экспериментально структурный фактор $F_{\text{эксп}}$ есть сумма вкладов от известных атомов и от всех атомов, чье положение еще следует найти (unknown) F_u :

$$F_{\text{эксп}}(h, k, l) = F_H(h, k, l) + F_u(h, k, l) \quad (13.92)$$

Однако здесь решающим является то обстоятельство, что $F_H(h, k, l)$, которые мы рассчитали, содержат информацию как об амплитудах, так и о фазах.

¹⁾ Книга переведена на русский язык: Бландел Т. Джонсон Л., Кристаллография белка: — М Мир, 1979. — *Прим.перев.*

4. Фазу вклада $F_H(h, k, l)$ можно использовать несколькими способами для оценки фазы, связанной с $F_{\text{эксп}}(h, k, l)$. Затем для оценки распределения электронной плотности, исходя из известных положений тяжелых атомов, можно провести фурье-синтез:

$$\rho(x, y, z) = \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} |F_{\text{эксп}}(h, k, l)| e^{i\phi_{hk,l}} e^{-2\pi i(hx + ky + lz)} \quad (13.93)$$

Здесь структурный фактор явно разделен на амплитудный и фазовый члены. Отметим, что существенно использовать именно *измеренные* амплитуды. Если в (13.93) используются расчетные и фазы, и амплитуды [т.е. если уравнение (13.91) просто подставляется в (13.93)], то в $\rho(x, y, z)$ нельзя получить ничего, кроме точно известных атомных положений, которые были подставлены в уравнение (13.91) при расчете $F_H(h, k, l)$.

5. В распределении электронной плотности, рассчитанном по уравнению (13.93) даже при неполной информации о фазах, появятся определенные максимумы, соответствующие положениям новых атомов или групп атомов. Их в свою очередь можно использовать в уравнении (13.91) для расчета более точных значений фаз; подставляя последние в (13.93), можно рассчитать новую карту электронной плотности. Этот процесс, называемый фурье-уточнением, продолжается до тех пор, пока не будут найдены положения всех атомов, соответствующие первоначальным или подкорректированным в процессе поиска ожиданиям.

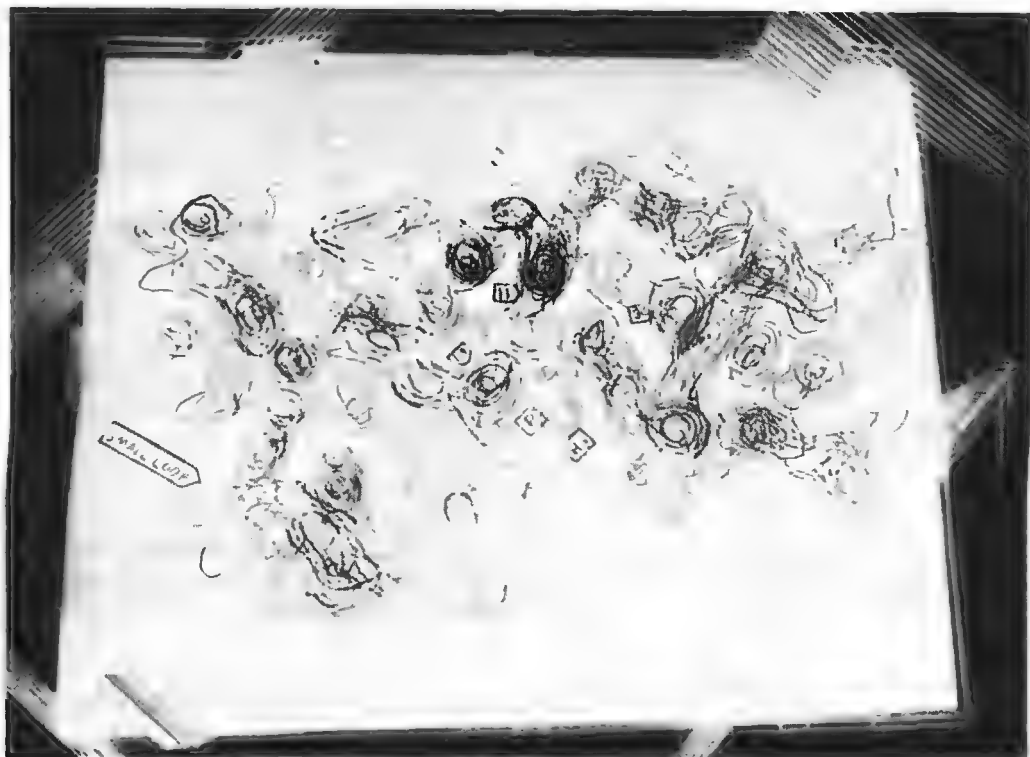


РИС. 13.29. Трехмерная карта электронной плотности рибонуклеазы S. Контуры равной плотности нанесены на прозрачные пластины из оргстекла, которые затем сложены стопкой.

6. На этом этапе структура все еще очень приближительна. Положения атомов из того первоначального набора, который использовался для «запуска» всего итерационного процесса, определены не слишком точно. Получающееся в результате распределение электронной плотности не очень четко. Обычно невозможно приписать точные координаты всем атомам. Более того, на результате сказываются экспериментальные ошибки определения структурных факторов, и их следует учитывать каким-то систематическим образом. Итак, шестой, последний этап определения структуры по рентгеновским данным состоит в том, чтобы, допуская небольшие изменения структуры молекул, добиться наибольшего согласия между рассчитанной структурой и наблюдаемыми данными. Один из способов этого, называемый уточнением по методу наименьших квадратов, будет описан дальше.

На практике при расчете $\rho(x, y, z)$ по уравнению (13.93) можно пользоваться лишь конечным набором значений x, y, z . Обычно рассчитывают ρ для плоских сечений кристалла (т.е. меняют x и y , а z оставляют постоянным). Но даже и в этом случае используются лишь дискретные значения x и y . По результирующим картинам электронной плотности строят гладкие контуры, отвечающие площадям равной плотности. Обычно для этого интерполируют имеющиеся данные. Отдельные двумерные сечения строятся с помощью ЭВМ. Эти сечения можно затем перенести на прозрачные пластины и наложить друг на друга так, чтобы получалось трехмерное изображение структуры. Один из таких примеров приведен на рис. 13.29. В другом случае созданные ЭВМ изображения можно вывести на экран телевизионной трубки под любым желаемым углом зрения.

ВЫЧИСЛЕНИЕ ФУНКЦИИ ПАТТЕРСОНА ПО ИЗМЕРЕННОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ РАССЕЯНИЯ

Измеряемые в дифракционном эксперименте интенсивности рассеяния даются следующим выражением:

$$I(\mathbf{S}) = |F(\mathbf{S})|^2 = F(\mathbf{S})F^*(\mathbf{S}) \quad (13.94)$$

где звездочкой обозначена комплексно-сопряженная величина. Если бы мы знали $F(\mathbf{S})$, то могли бы подвергнуть его преобразованию Фурье и получить распределение электронной плотности во всем кристалле. Если же вместо этого мы применим преобразование Фурье непосредственно к $I(\mathbf{S})$, то получим результат, называемый функцией Паттерсона:

$$P = \int_{-\infty}^{\infty} I(\mathbf{S}) e^{-2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} d\mathbf{S} = \int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{S} F(\mathbf{S}) F^*(\mathbf{S}) e^{-2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} \quad (13.95)$$

Это — уравнение для фурье-преобразования произведения двух функций, $F(\mathbf{S})$ и $F^*(\mathbf{S})$. В соответствии с уравнением (13.52) ему соответствует свертка фурье-образов¹⁾ функций $F(\mathbf{S})$ и $F^*(\mathbf{S})$. Фурье-образ $F(\mathbf{S})$ имеет вид

$$\int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{S} e^{-2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} F(\mathbf{S}) = \rho(\mathbf{r}) \quad (13.96)$$

[см. уравнение (13.8)]. Что является трансформантой $F^*(\mathbf{S})$? Поскольку $\rho(\mathbf{r})$ — действительная величина, $F^*(\mathbf{S})$ равно [см. уравнение (13.7)]

¹⁾ Фурье-образ, фурье-преобразование, фурье-трансформанта — эквивалентные термины. — Прим. перев.

$$F^*(\mathbf{S}) = \left(\int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{r} e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} \rho(\mathbf{r}) \right)^* = \int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{r} e^{-2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} \rho(\mathbf{r}) = \int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{r} e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}} \rho(-\mathbf{r}) \quad (13.97)$$

Следовательно, фурье-трансформанта $F^*(\mathbf{S})$ по аналогии с тем, что показано в уравнениях (13.9) и (13.11), представляет собой не что иное, как $\rho(-\mathbf{r})$. Это электронная плотность, инвертированная относительно начала координат. Таким образом,

$$P = \widehat{\rho(\mathbf{r})\rho(-\mathbf{r})} = \int_{-\infty}^{\infty} d\mathbf{r} \rho(\mathbf{r})\rho(\mathbf{u} + \mathbf{r}) \quad (13.98)$$

Физический смысл свертки помогает до некоторой степени «почувствовать» свойства функции Паттерсона. Рис. 13.30 иллюстрирует простой случай. На нем показан двумер-

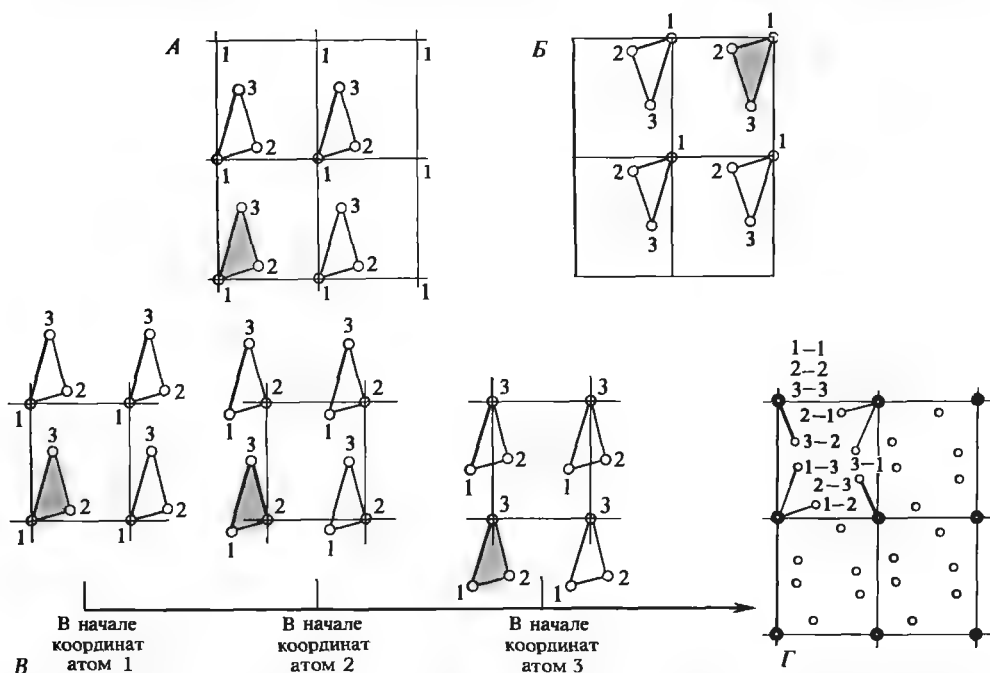


РИС. 13.30. Функция Паттерсона для трехатомной структуры. А. Четыре ячейки исходной решетки; молекула в начале координат затенена. Б. Те же четыре ячейки, инвертированные относительно начала координат. В. Построение свертки совокупностей атомов, показанных на фрагментах А и Б рисунка. Положение каждого из атомов во фрагменте Б используется как начальная точка для построения изображения структуры, показанной на фрагменте А. Отметим, например, что когда начало координат исходной структуры А помещается в положение атома 2 инвертированной структуры Б, то атом 1 исходной структуры смещен из начала координат инвертированной ячейки, но атом 2 оказывается как раз в этом начале координат. Поэтому свертку можно выполнить, просто строя последовательные изображения фрагмента А с каждым атомом, поочередно находящимся в начале координат. Г. Окончательная свертка, получающаяся в результате сложения вкладов, изображенных отдельно на фрагменте В. Цифры около кружков указывают, каким образом возник каждый из них. Например, 1-2 означает, что эта точка есть изображение атома 2, которое получилось, когда структура была помещена в положение атома 1. (Glusker J.P., Trueblood K.N. Crystal Structure Analysis: A Primer, London, Oxford Univ. Press, 1972.)

ный кристалл, в элементарной ячейке которого содержится одна трехатомная молекула. Рис. 13.30,А показывает действительную структуру кристалла, а рис. 13.30,Б — кристалл, инвертированный относительно начала координат. Мы хотим получить свертку этих двух структур. Прежде всего рассмотрим элементарные ячейки действительного и инвертированного кристаллов. Свертка образуется при последовательном переборе всех атомов в инвертированной структуре. Выстроим изображение структуры действительной ячейки, совмещая начало ее координат (левый нижний угол) с выбранным атомом инвертированной структуры, и «взвесим» наше изображение путем умножения на электронную плотность этого атома.

Отметим, что при совмещении начала действительной ячейки с атомом инвертированной структуры в положении γ соответствующий атом, находящийся в положении γ в действительной структуре, оказывается в начале инвертированной ячейки. Следовательно, свертку можно воссоздать, не обращая внимания на инвертированную структуру, а просто последовательно сдвигая изображение ячейки таким образом, чтобы каждый атом оказывался в свою очередь в начале координат¹⁾, и складывая взвешенные изображения структуры (рис. 13.30,В).

В структуре имеются три атома. Последовательные изображения, получающиеся при помещении каждого атома в начало координат, также содержат по три атома. Таким образом, в каждой ячейке пространства свертки появится всего девять атомных изображений, причем три из них попадут в начало координат (рис. 13.30,Г). В общем случае молекулы с N атомами в кристаллической ячейке функция Паттерсона будет иметь в элементарной ячейке пространства свертки N^2 пиков. N из этих пиков окажутся в начале координат, а оставшиеся $N(N - 1)$ как-то распределятся внутри элементарной ячейки. Очевидно, что пользоваться функцией Паттерсона или интерпретировать ее тем труднее, чем больше N .

ПЕРИОДИЧНОСТЬ ФУНКЦИИ ПАТТЕРСОНА

Свертка, описываемая уравнением (13.98), проводится в действительности не по элементарной ячейке, а по всему кристаллу. Это приводит к простому следствию. Рассмотрим решетку, у которой в каждой вершине элементарной ячейки находится один атом. Если для построения изображения кристалла использовать какой-то один выбранный атом, то придется последовательно помещать этот атом в каждую вершину каждой ячейки. При выборе любого другого атома получатся в точности такие же изображения.

Аналогичные соображения приложимы и к молекулярному кристаллу. Выберем один атом в определенной ячейке и построим изображение кристалла. Теперь выберем соответствующий первому атом в какой-нибудь другой ячейке и повторим процедуру. Получающиеся в результате изображения совпадают, за исключением того, что кристалл смещен в пространстве на целое число ячеек. Таким образом, функция Паттерсона так же, как и электронная плотность, периодически повторяется по всему кристаллу. Всю интересующую нас информацию можно получить при рассмотрении одной ячейки. В действительности интенсивность $I(\mathbf{S})$ не является непрерывной функцией, она существует лишь в узлах обратной решетки. Таким образом, по аналогии с уравнением (13.39) интеграл в (13.95) заменяется суммой

¹⁾ Изображенная на фрагменте В прямоугольная ячейка, в которой строится свертка, — это уже ячейка в пространстве свертки $\mathbf{u}$. О ее начале координат и идет речь. На фрагменте Г тоже показана соответствующая часть пространства свертки. — *Прим. перев.*

$$P(x, y, z) = \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} |F(h, k, l)|^2 e^{-2\pi i(hx + ky + lz)} \quad (13.99)$$

СООТВЕТСТВИЕ МЕЖДУ ПИКАМИ ФУНКЦИИ ПАТТЕРСОНА И МЕЖАТОМНЫМИ ВЕКТОРАМИ

Есть и другое описание функции Паттерсона, которое помогает понять, какая в ней заключена структурная информация. Отметим сначала, что при изменении начала координат, выбираемого для построения элементарных ячеек, получающаяся функция Паттерсона остается неизменной. Эта функция все равно строится путем помещения поочередно каждого атома в начало координат ячейки. Следовательно, все пики в функции Паттерсона должны отражать «внутреннее устройство» элементарной ячейки.

Предположим, в элементарной ячейке имеются три атома в положениях $\mathbf{r}_1$, $\mathbf{r}_2$ и $\mathbf{r}_3$. Когда изображение строится при смещении в начало координат того атома, который находился в положении $\mathbf{r}_1$, то пики в изображении располагаются в точках с радиусами-векторами $\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_1$, $\mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1$ и $\mathbf{r}_3 - \mathbf{r}_1$. Следовательно, эти пики в функции Паттерсона соответствуют просто векторам, проведенным от каждого атома к атому в положении $\mathbf{r}_1$. Когда за начало координат берется атом $\mathbf{r}_2$, мы получаем пики для векторов, проведенных от всех атомов к атому в положении $\mathbf{r}_2$ и т.д. Таким образом, в функции Паттерсона просто представлен набор всех векторов между парами атомов в структуре. Понятно, что этот набор не зависит от выбора начала координат. Воспользовавшись этими физическими соображениями, функцию Паттерсона можно переписать в виде

$$P = \sum_j \sum_k \rho_j \rho_k (\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_k) \quad (13.100)$$

где при помощи каждого из индексов j и k перебираются все атомы в элементарной ячейке с электронной плотностью ρ .

Паттерсоновская карта содержит более чем достаточно информации для определения структуры. Проблема, однако, заключается в том, что не существует эффективной или легкой стратегии использования этой информации. К сожалению, пики в функции Паттерсона не помечены. Нет простого способа решить, какую пару атомов представляет данный пик на паттерсоновской карте. Чтобы извлечь из функции Паттерсона данные о структуре, следует «развернуть»¹⁾ эту функцию. Если мы имеем дело всего с несколькими атомами, это можно легко сделать «в лоб». Если же, с другой стороны, положения нескольких атомов уже известны, то для того, чтобы развернуть функцию Паттерсона, можно использовать суперпозиционные методы (см. Blundell, Johnson, 1976; Stout, Jensen, 1968).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПАТТЕРСОНОВСКИХ КАРТ ДЛЯ ЛОКАЛИЗАЦИИ ТЯЖЕЛЫХ АТОМОВ В МАЛЫХ МОЛЕКУЛАХ

В случае сложных молекул трудность интерпретации паттерсоновской карты есть прямое следствие большого числа межатомных векторов. Допустим, однако, что в структуре имеются два или большее число тяжелых атомов на элементарную ячейку. Атомный фактор рассеяния пропорционален числу электронов z [уравнение (13.23)]. В таком случае ве-

¹⁾ Операция, обратная свертке. — Прим. перев.

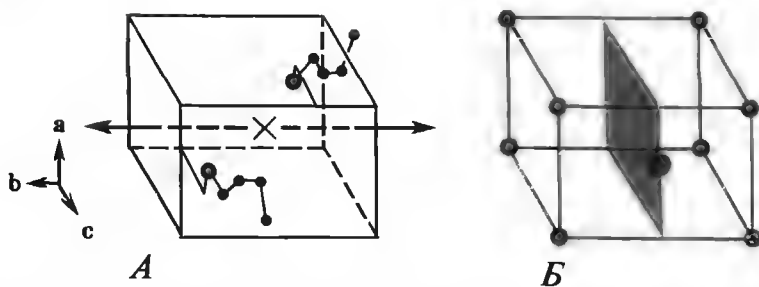


РИС. 13.31. Определение положения тяжелых атомов. А. Элементарная ячейка кристалла с пространственной группой симметрии $P2_1$. В каждой ячейке содержатся две молекулы, причем в каждой присутствует тяжелый атом. Б. Функция Паттерсона для объекта, представленного на фрагменте А. Показаны пики, соответствующие векторам тяжелый атом — тяжелый атом. Закрашено харкеровское сечение.

личины наблюдаемых интенсивностей, а соответственно и паттерсоновских пиков, обусловленных атомами i и j , пропорциональны $z_i z_j$ [это соответствует членам $\rho_i \rho_j$ в (13.100)]. Отсюда следует, что на паттерсоновской карте должны прежде всего проявляться межатомные векторы, соответствующие парам тяжелых атомов. При ограниченном числе тяжелых атомов обычно удастся достаточно много узнать об их положении и использовать эту информацию для дальнейшего уточнения и структурного анализа.

В большинстве случаев пространственные группы таковы, что молекулы в элементарной ячейке связаны друг с другом операциями симметрии. Если каждая молекула содержит тяжелый атом, то межатомный вектор таких связанных симметрией атомов попадает на паттерсоновской карте в легко идентифицируемую область. Рассмотрим пример, приведенный на рис. 13.31. Это моноклинный кристалл с двумя молекулами в элементарной ячейке и пространственной группой $P2_1$. Направлению $\mathbf{b}$ параллельна винтовая ось второго порядка. Если в положении $x'\mathbf{a} + y'\mathbf{b} + z'\mathbf{c}$ имеется тяжелый атом, то другой такой атом должен находиться в положении $-x'\mathbf{a} + (y' + 1/2)\mathbf{b} - z'\mathbf{c}$. Соответствующий межатомный вектор на паттерсоновской карте есть $2x'\mathbf{a} - (1/2)\mathbf{b} + 2z'\mathbf{c}$. Таким образом, x' и z' можно определить путем нахождения пика в плоскости $(1/2)\mathbf{b}$ паттерсоновской карты.

В результате этой процедуры неопределенным остается y' . Однако для пространственной группы $P2_1$ это не столь серьезная проблема. В данном случае нет какого-либо единственного начала координат вдоль оси $\mathbf{b}$, и поэтому y' можно приписать произвольное значение.

Плоскости или линии, где появляются связанные симметрией паттерсоновские векторы, называются сечениями Харкера. Если при их анализе удастся идентифицировать один или несколько паттерсоновских векторов, то для нахождения других можно иногда использовать суперпозиционные методы. Каждое харкеровское сечение будет содержать не только векторы тяжелый атом — тяжелый атом, но и все другие векторы, связанные между собой той же операцией симметрии. За исключением случайных совпадений, такое сечение не будет содержать векторов между тяжелым и легким атомами. Контраст, создаваемый парой тяжелых атомов, будет определяться тем, насколько величина z_h^2 больше соответствующих величин z_l^2 для пар легких атомов. Здесь возникает вопрос, насколько тяжелым должен быть атом. Общее правило гласит, что должно выполняться неравенство $z_h^2 \geq \sum z_l^2$, где суммирование проводится по всем легким атомам. Для типично-легкого атома $z_l = 7$. Таким образом, один тяжелый атом, например ртуть с $z_h = 80$, можно найти в структуре, насчитывающей до 130 легких атомов. Но его нельзя найти на паттерсоновской карте типичного белка, содержащего от 1000 до 10 000 атомов.

ПРОВЕРКА СОГЛАСИЯ МЕЖДУ РАССЧИТАННОЙ СТРУКТУРОЙ И ДАННЫМИ ИЗМЕРЕНИЙ

Как можно сделать заключение о том, что рассчитанная структура согласуется с данными дифракционных измерений? Наиболее общепринятым критерием согласия считается значение величины R (R -фактор) вида

$$R = \sum |F_{\text{эксп}}| - |F_{\text{рассч}}| / \sum |F_{\text{эксп}}|, \quad (13.101)$$

где $|F_{\text{рассч}}|$ представляет структурные факторы, рассчитанные для модели всей структуры по уравнению (13.70). Таким образом, R -фактор, по существу, служит мерой того, насколько экспериментально наблюдаемые данные $|F_{\text{эксп}}|$ близки к данным, ожидаемым для рассчитанной структуры $|F_{\text{рассч}}|$.

Пусть наша модель структуры столь приближительна, что ее можно представить просто как случайное скопление внутри элементарной ячейки нужного числа атомов нужных типов с нужной симметрией. Показано, что в этом случае R -фактор будет равняться 0,59 для пространственной группы без центра симметрии и 0,83 при наличии центра симметрии. В соответствии с очень грубым правилом можно считать, что при $R \approx 0,45$ пробная структура не совсем бессмысленна, при $R \approx 0,35$ — мы на более или менее верном пути, $R \approx 0,25$ означает, что в пределах ошибки порядка 0,1 Å положения большинства атомов определены верно. Для небольших органических структур можно добиться уточнения до $R < 0,05$. Для белков R -факторы на ранних стадиях определения структуры обычно велики. Это объясняется тем, что влияния растворителя и теплового движения атомов принимаются в расчет лишь на более поздних стадиях исследования.

Заметим, что R -фактор, равный 0,25, в действительности подразумевает такую степень несогласия между наблюдаемыми и рассчитанными амплитудами, которая в большинстве методов считается недопустимой. Вероятно, будет справедливым сказать, что количество рентгеновских данных компенсирует недостаток качества отдельных экспериментальных точек.

13.5. Определение структуры макромолекулы

МЕТОД МНОЖЕСТВЕННЫХ ИЗОМОРФНЫХ ЗАМЕЩЕНИЙ

Методы, описанные выше для малых молекул, не приводят к успеху при работе с белками и нуклеиновыми кислотами. Эти большие молекулы в общем случае не содержат удобно расположенных тяжелых атомов. Даже если такие атомы и попадают, все равно сложность структуры требует иных подходов для ее определения. Типичное кристаллографическое исследование макромолекул состоит из следующих этапов:

1. Сначала пытаются вырастить подходящие кристаллы нативной макромолекулы. (В кристаллографии белков и нуклеиновых кислот этот этап самый трудный и требует к тому же больших временных затрат. Во многих случаях образуются макромолекулярные кристаллы, совершенные морфологически, но степень беспорядка в них столь велика, что невозможно получить дифракционные данные высокого разрешения.) Используя выращенные кристаллы, определяют пространственную группу симметрии, размеры элементарной ячейки, а затем получают набор данных об амплитудах рассеяния.

2. На этом этапе пытаются получить несколько изоморфных производных, содержащих тяжелые атомы (тяжелоатомных изоморфных производных). Они представляют собой кристаллы с такими же элементарной ячейкой, пространственной группой и макромолекулярной структурой, что и исходный кристалл, только в специальные положения введен один или несколько

тяжелых атомов. Для каждого производного получают новый набор данных об амплитудах рассеяния.

3. Теперь пытаются определить положения тяжелых атомов в кристалле. Распространенный способ сделать это — построить карту разностного изоморфного паттерсоновского синтеза (см. ниже).

4. На данной стадии пытаются уточнить положения, приписываемые тяжелым атомам, для чего используют либо методы разностного фурье-уточнения, до некоторой степени подобные описанным в случае малых молекул, либо более сложную технику.

5. Сравнивая данные о структурных факторах для исходного кристалла с соответствующими данными для одного или нескольких тяжелоатомных производных, можно оценить фазы каждого $F(h, k, l)$ для *исходного* кристалла. В общем случае чем большим числом тяжелоатомных производных мы располагаем, тем точнее будут оценки фаз.

6. Воспользовавшись данными о фазах для исходного кристалла, полученными на предыдущем этапе, часто удается осуществить дальнейшее уточнение положений тяжелых атомов, используя метод наименьших квадратов или разностный фурье-синтез. Эта процедура в свою очередь приводит к еще лучшим оценкам фаз для исходного кристалла.

7. Воспользовавшись этими фазами и наблюдаемыми амплитудами каждого $F(h, k, l)$, рассчитывают с помощью (13.93) карту электронной плотности.

8. Строят модель карты электронной плотности. Обычно на этой стадии используются только данные низкого разрешения (5,5—7 Å), и поэтому на карте электронной плотности нет хорошо разрешенных структурных деталей. Затем этапы 4—8 повторяют с данными более высокого разрешения (2,5 — 3 Å), до тех пор пока не оказывается возможным построить молекулярную модель.

9. Иногда пытаются уточнять полученную структуру. Например, с помощью уравнения (13.70) можно рассчитать фазы, исходя из положений атомов в молекулярной модели, а затем использовать эти фазы вместо тех, которые определены на этапах 5 и 6. Уточнение может основываться на фурье-синтезе или на методе наименьших квадратов; оно может опираться или только на рентгеновские данные, или, помимо рентгеновских, и на данные об энергии различных конформаций белка.

Большинство этих стадий обсуждается более детально ниже.

ПОЛУЧЕНИЕ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ КРИСТАЛЛОВ И ИХ СВОЙСТВА

Для кристаллографического изучения молекулы с мол. массой 50 000 нужны кристаллы, имеющие размер около 0,3 мм в каждом измерении. Для получения таких кристаллов необходимо, вообще говоря, приготовить пересыщенный раствор макромолекул и контролировать скорость образования зародышей и роста кристаллов. Растворимость можно менять, варьируя pH, концентрацию и тип соли, температуру раствора, а также добавляя органические растворители.

Одним из удобных способов контроля скорости изменения многих из этих параметров является диализ. Другой способ основан на диффузии паров. При этом способе капли раствора макромолекул дают возможность прийти в равновесие (через парообразную фазу) с раствором, помещенным в отдельный сосуд. Если, например, концентрация соли в таком сосуде выше, чем в образце, то растворитель будет постепенно «уходить» из образца. Дальнейшие детали этих и других методов приводятся в литературе (см. Blundell T.L., Johnson L.N., 1976).

Кристаллы белков и нуклеиновых кислот отличаются от кристаллов малых молекул в одном важном отношении: в них содержится значительное количество (обычно 50%) жидкого растворителя. Известны случаи, когда кристаллы белков или нуклеиновых кис-

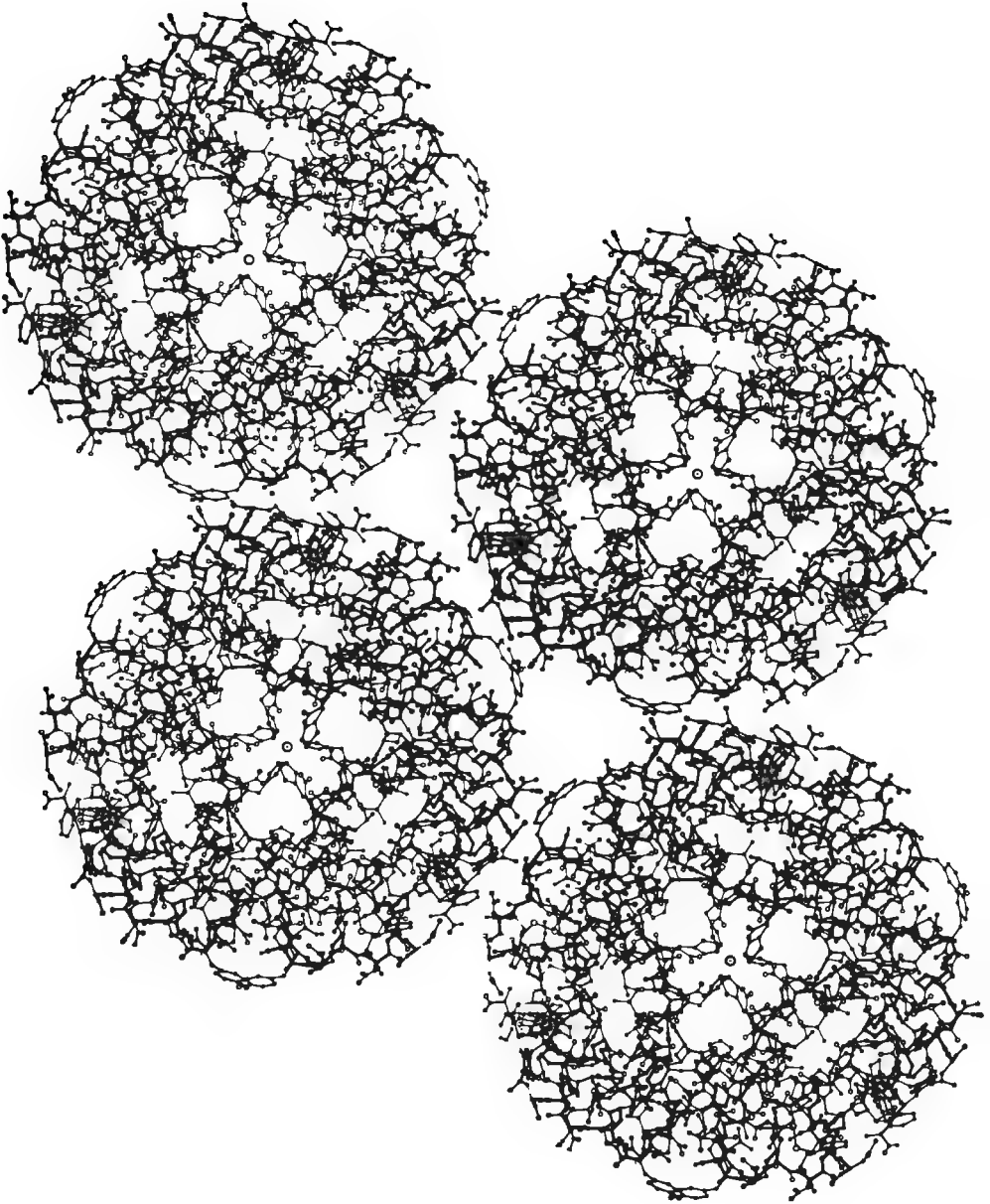


РИС. 13.32. Сечение кристалла инсулина. Каждая клинообразная единица структуры — один мономер. Такие мономеры объединяются в димеры, которые в свою очередь агрегируют в гексамеры, а последние уже упаковываются в кристалл. Отметим наличие широких каналов, заполняемых растворителем, и относительно малое число непосредственных контактов между гексамерами. Показаны все атомы, кроме водорода. [Blundell T.L., Hodgkin D.C., Dodson G.G., Mercola D.A., *Adv. Protein Chem.*, 26, 279 (1972).]

лот более чем на две трети (по массе) состоит из растворителя. В типичном кристалле растворителя намного меньше, но все равно он (кристалл) обычно напоминает двухфазную систему. Твердая фаза образована макромолекулами, которые соприкасаются друг с другом лишь в нескольких участках. Между ними существует система открытых каналов, заполненных растворителем (рис. 13.32)

Наличие большого количества растворителя в кристаллах обеспечивает некоторые преимущества. Оно позволяет малым молекулам диффундировать в кристалл. Как мы увидим дальше, это способствует внедрению тяжелых атомов и позволяет вводить в уже образовавшийся кристалл субстраты или лиганды и, таким образом, дает возможность изучать структуру комплексов макромолекулы с лигандом. В самом деле, некоторые ферменты вполне активны в кристаллическом состоянии. Наконец, благодаря большому количеству растворителя, весьма вероятно, что структура, найденная для молекулы в кристалле, окажется близкой к ее структуре в растворе.

Но с большим количеством растворителя связан и один недостаток. Некоторая часть растворителя, близко расположенная к макромолекуле, обладает хорошо упорядоченной структурой. Поэтому ее вклад в наблюдаемое рассеяние становится ощутимым, что должно учитываться при определении структуры. Правда, с другой стороны, когда уже известна полная структура, это позволяет подойти к выяснению вопроса, как макромолекулы взаимодействуют с растворителем.

ПОЛУЧЕНИЕ ИЗОМОРФНЫХ ТЯЖЕЛОАТОМНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ

Для определения почти всех известных на сегодняшний день структур белков и нуклеиновых кислот был использован метод множественного изоморфного замещения. Этот метод требует набора из трех или большего числа кристаллов: исходного кристалла и по крайней мере двух других кристаллов с идентичной пространственной группой и одинаковой молекулярной структурой, но с одним или несколькими тяжелыми атомами. Вообще говоря, тяжелые атомы могут либо замещать какие-то атомы в исходной структуре, либо быть добавками к ней. Мы ограничим наше рассмотрение последним случаем, поскольку он поддается несколько более легкой математической трактовке, но в конечном счете оба случая совершенно эквивалентны.

Можно было бы получить изоморфное производное, присоединяя ковалентно тяжелый атом к макромолекуле в растворе и создавая затем для нее условия кристаллизации. Практически, однако, такой подход не обязательно оказывается эффективным. Факторы, способствующие формированию хороших кристаллов, настолько изменчивы, что часто даже небольшое химическое изменение структуры либо препятствует кристаллизации, либо приводит к нарушению изоморфности получающихся кристаллов. Поэтому почти всегда начинают работать с уже сформировавшимся кристаллом немодифицированной макромолекулы и создают условия, при которых в него могут диффундировать реагенты, содержащие тяжелые атомы. Такой метод позволяет с большим основанием надеяться, что кристаллическая упаковка и молекулярная структура останутся в значительной степени неизменными. В табл. 13.2 перечисляются некоторые типы используемых реагентов, а в табл. 13.3 суммируются результаты.

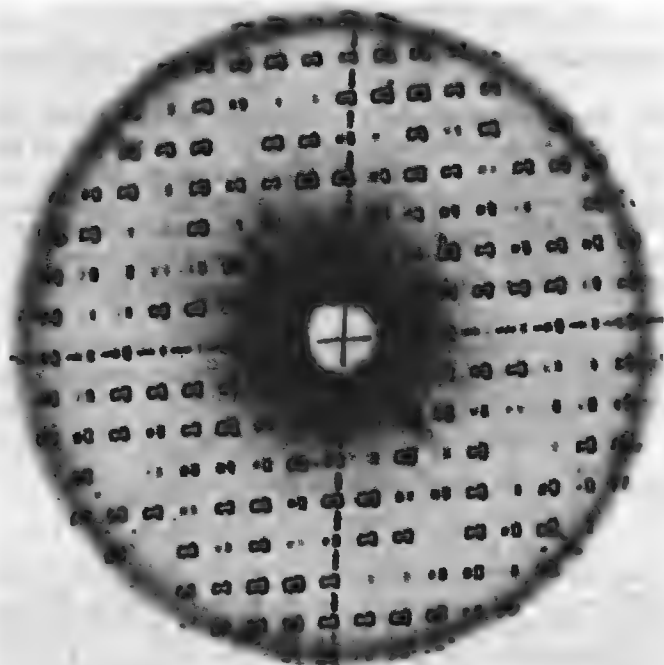


РИС. 13.33. Изоморфное замещение. Две наложенные одна на другую прецессионные рентгенограммы триклинных кристаллов лизоцима слегка сдвинуты по горизонтали. В каждой паре пятен левое создано кристаллом нативного лизоцима, правое — кристаллом, полученным после диффузии HgBr_2 . Показаны рентгенограммы плоскости $(0, k, l)$ обратной решетки. Явно видны различия в интенсивности. (Dickerson R. In: The Proteins, 2d ed., vol. 2, ed. H. Neurath, New York, Academic Press, 1964.)

После создания изоморфного производного для него получают дифракционные данные и сравнивают их с данными для немодифицированного кристалла. Обратная решетка и симметрия должны остаться прежними, но наблюдаемые интенсивности некоторых отражений могут заметно изменяться (рис. 13.33). Благодаря этому различию можно оценить фазы наблюдаемых структурных факторов. Однако прежде необходимо определить положения тяжелых атомов; этой процедуре посвящено несколько следующих разделов.

СТРУКТУРНЫЕ ФАКТОРЫ ДЛЯ ТЯЖЕЛОАТОМНЫХ ИЗОМОРФНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ

Электронная плотность изоморфного производного с тяжелым атомом есть не что иное, как сумма электронных плотностей исходного кристалла и добавок, обусловленных тяжелым атомом. Следовательно, структурный фактор F_{PH} тяжелоатомного изоморфного производного должен быть следующим образом связан со структурным фактором исходного (parent) кристалла F_{P} и структурным фактором тяжелых (heavy) атомов F_{H} :

$$F_{PH}(h, k, l) = F_P(h, k, l) + F_H(h, k, l) \quad (13.102)$$

поскольку дополнительное рассеяние в производном вызвано лишь наличием тяжелых атомов.

Заметим, однако, что все три величины в (13.102) комплексные. Смысл этого уравнения легче всего понять, если представить каждую величину в виде вектора на комплексной плоскости (см. рис. 13.4). При сложении двух комплексных чисел нужно просто сложить по отдельности их действительные и мнимые части. Поэтому при векторном представлении два комплексных числа складываются точно так же, как векторы, т.е. покомпонентно. В результате также получается вектор на комплексной плоскости. (рис. 13.34). Такое векторное уравнение должно выполняться для каждого набора индексов h, k, l структурных факторов.

Если известны любые из двух векторов, изображенных на рис. 13.34, то третий можно определить однозначно. Главная трудность рентгеноструктурного анализа макромолекул состоит в том, что в эксперименте можно прямо измерить только *длины* и только *двух* векторов: $|F_P|$ и $|F_{PH}|$.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛОЖЕНИЯ ТЯЖЕЛЫХ АТОМОВ С ПОМОЩЬЮ РАЗНОСТНОЙ ПАТТЕРСОНОВСКОЙ КАРТЫ

Обычную паттерсоновскую карту [уравнение (13.95)] нельзя использовать для определения положения тяжелых атомов в макромолекулярном кристалле. Ранее мы показали, что контраст между векторами тяжелый атом — тяжелый атом и остальными векторами недостаточен. Однако при наличии как исходного кристалла, так и изоморфного тяжелоатомного производного можно построить разностную изоморфную паттерсоновскую карту, используя измеренные амплитуды структурных факторов, или структурные амплитуды $|F_{PH}(h, k, l)|$ и $|F_P(h, k, l)|$.

Истинную паттерсоновскую карту векторов, соединяющих тяжелые атомы, можно получить с помощью уравнения (13.95)

$$P_H = (1/V) \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} |F_H(h, k, l)|^2 e^{-2\pi i(hx + ky + lz)} \quad (13.103)$$

но мы не можем рассчитать эту карту прямо, поскольку $|F_H(h, k, l)|$ экспериментально измерить нельзя. Оказывается, однако, что часто в хорошем приближении $|F_H|$ можно записать как

$$|F_H| = ||F_{PH}| - |F_P|| \quad (13.104)$$

Итак, можно получить оценку $|F_H|$ по измеренным структурным амплитудам исходного кристалла и тяжелоатомного изоморфного производного. В этом случае изоморфная разностная функция Паттерсона ΔP вычисляется следующим образом:

$$\Delta P = (1/V) \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} ||F_{PH}| - |F_P||^2 e^{-2\pi i(hx + ky + lz)} \quad (13.105)$$

Можно показать, что в идеальном случае в этой функции будет представлен вектор тяжелый атом — тяжелый атом (с половинным значением ожидаемой для него интенсивности пика) плюс некий «паразитный» шум от векторов, связывающих легкие атомы (Blundell, Johnson, 1976).

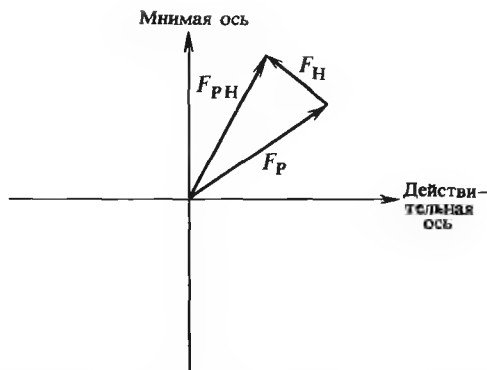


РИС. 13.34. Структурные факторы, представленные на комплексной плоскости, для дифракционного пятна от исходного кристалла, для тяжелоатомной изоморфной добавки и для дифракционного пятна от производного.

Точность и эффективность уравнения (13.105) зависят от того, насколько хорошо выполняется уравнение (13.104). Это в свою очередь зависит от относительных фаз и от амплитуд трех участвующих в рассмотрении структурных факторов. Особый упрощенный случай мы обсудим ниже, здесь же отметим следующее. Если два вектора F_{RH} и F_R в уравнении (13.102) параллельны, то все фазы одинаковы и (13.104) оказывается точным уравнением. Если же все три вектора почти параллельны, то (13.104) будет прекрасным приближением. Наибольшие значения $||F_{RH}| - |F_R||$ будут стремиться к тем, которые получаются при параллельных F_{RH} и F_R . Таким образом (что очень удобно), наибольшие члены, входящие в уравнение (13.104), будут, вероятнее всего, давать хорошие оценки $|F_H|$. Включая в (13.105) только наибольшие члены, часто удается создать улучшенную тяжелоатомную разностную паттерсоновскую карту. Зная векторы, связывающие тяжелые атомы, можно с помощью методов, описанных в Дополнении 13.6, попытаться найти действительные положения тяжелых атомов.

Для того чтобы уравнение (13.104) было действительно полезным, необходимо, чтобы присутствие тяжелого атома в изоморфном производном приводило к таким изменениям интенсивности рассеяния, которые позволяют измерить разность между $|F_{RH}|$ и $|F_R|$. К примеру, один атом ртути с 80 электронами даст среднее различие между $|F_R|$ и $|F_{RH}|$ в 30% для белка с мол. массой 40 000. Этого более чем достаточно для построения разностной паттерсоновской карты.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЦЕНТРОСИММЕТРИЧНЫХ ПРОЕКЦИЙ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛОЖЕНИЯ ТЯЖЕЛЫХ АТОМОВ

Кристалл биологического вещества не может иметь центра симметрии, поскольку молекулы содержат асимметричные углеродные атомы. Однако часто можно найти центросимметричную проекцию (см. Дополнение 13.5). Например, если структура обладает поворотной или винтовой осью второго порядка, то проекция на плоскость, перпендикулярную этой оси, будет иметь центр симметрии. Для этой двумерной проекции фазы структурных факторов должны равняться либо 0, либо π , и, значит, все структурные

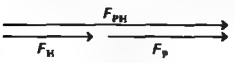
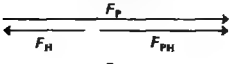
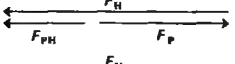
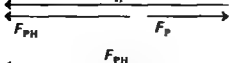
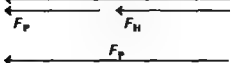
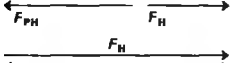
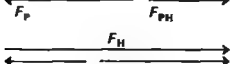
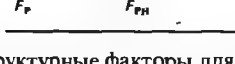
Структурные факторы	Знаки		Измеряемое изменение амплитуды
	F_P	F_H	$\Delta F = F_{PH} - F_P $
	+	+	+
	+	-	-
	+	-	-
	+	-	+
	-	-	+
	-	+	-
	-	+	-
	-	+	+

РИС. 13.35. Структурные факторы для центросимметричной проекции. С помощью соответствующих векторов показаны все возможные комбинации структурных факторов исходного кристалла (индекс Р), тяжелого атома (индекс Н) и изоморфного производного (индекс РН). Вектору, направленному слева направо, приписан положительный знак (нулевой фазовый угол).

факторы — либо параллельные, либо антипараллельные векторы. Это существенно упрощает использование уравнения (13.102).

Для центросимметричной проекции структурные факторы исходного кристалла, тяжелоатомного изоморфного производного, а также тяжелых атомов должны быть связаны друг с другом одним из способов, показанных на рис. 13.35. Если F_{PH} и F_P имеют одинаковое направление, то, очевидно, $|F_H| = ||F_{PH}| - |F_P||$, что позволяет непосредственно вычислить $|F_H|$ из экспериментальных данных. Только при условии, что $|F_H|$ намного больше $|F_P|$, возможны случаи, когда уравнение (13.104) становится неверным. Эти случаи, которые называют *перекрестами*, очень редки и не снижают в заметной мере значения большинства тяжелоатомных изоморфных разностных паттерсоновских проекций.

На рис. 13.36 приведен пример трех разностных паттерсоновских проекций для тяжелоатомных производных цитохрома с. Они были получены с помощью уравнения (13.105). Две относительно простые карты (рис. 13.36, А, Б) относятся к Рt- и Hg-производным. Более сложная карта (рис. 13.36, В) была получена для кристалла, куда были введены оба этих металла одновременно. На этой карте есть как векторы Hg—Рt, так и векторы Hg—Hg и Рt—Рt. С помощью этих карт можно оценить координаты и Рt, и Hg (см. Дополнение 13.6).

Ниже мы покажем, как в некоторых случаях положения тяжелых атомов, найденные по разностной паттерсоновской карте, прямо используются для определения фаз белка. В большинстве же случаев эти положения должны быть вначале уточнены. (Методы уточнения рассматриваются ниже.)

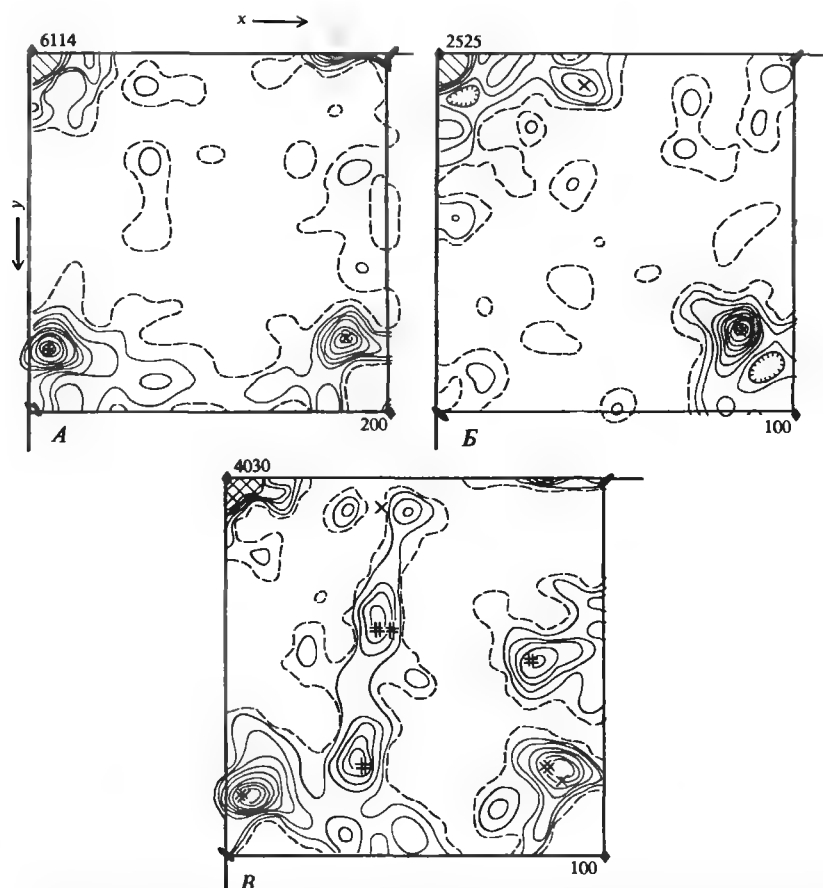


РИС. 13.36. Разностные паттерсоновские карты, рассчитанные для проекции кристаллов цитохрома *c* на плоскость $x - y$. Начало координат находится в верхнем левом углу каждой карты. Все карты нарисованы в одном масштабе; интервалы между контурами указаны в нижних правых углах, высота пика в начале координат — в верхних левых углах. Нулевые контуры показаны пунктиром. Указаны координаты x и y ; они изменяются лишь от 0 до половины соответствующего размера элементарной ячейки. Паттерсоновские пики с единичным весом обозначены x , с двойным весом — $*$. А. Платиновое производное. Б. Ртутное производное. В. Производное, содержащее оба металла; векторы Pt — Hg обозначены $\#$. [Dickerson R.E. et al., J. Mol. Biol., 29, 77 (1967).]

Дополнение 13.6

ПРИМЕР ИНТЕРПРЕТАЦИИ РАЗНОСТНОЙ ПАТТЕРСОНОВСКОЙ ПРОЕКЦИИ

Разностная паттерсоновская карта, показанная на рис. 13.36, А, была рассчитана для проекции на плоскость, перпендикулярную оси *c* тетрагонального кристалла цитохрома *c* ($a = b = 58,45 \text{ \AA}$;

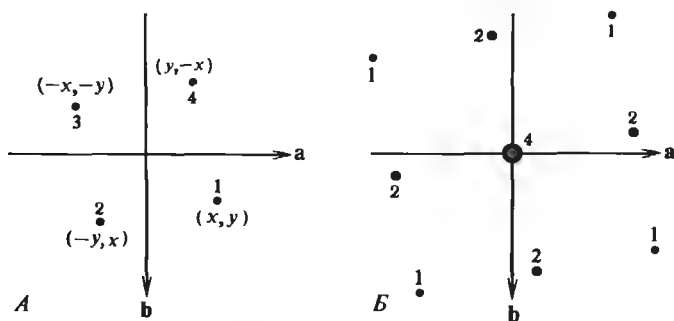
$c = 42,34 \text{ \AA}$):

$$\Delta P(x, y) = (1/4) \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} [|F_{PH}(h, k, 0)| - |F_P(h, k, 0)|]^2 e^{-2\pi i(hx + ky)}$$

где $|F_{PH}|$ и $|F_P|$ — квадратные корни из измеренных интенсивностей рассеяния для тяжелоатомного изоморфного платинового производного и для исходного кристалла соответственно. Таким образом, $\Delta P(x, y)$ можно вычислить по данным, полученным для одного слоя обратной решетки.

Пространственная группа симметрии этих кристаллов — $P4_1$, асимметричная единица — одна молекула цитохрома c . В элементарной ячейке содержатся четыре молекулы, связанные между собой винтовой осью четвертого порядка. При проецировании структуры в направлении, перпендикулярном оси c , все четыре молекулы оказываются в плоскости $a-b$, где они связаны друг с другом уже поворотной осью четвертого порядка. Благодаря наличию этой оси в двумерной структуре имеется также и центр симметрии.

Эту симметрию можно использовать для предсказания того, как должна выглядеть разностная паттерсоновская карта в случае одного тяжелого атома, занимающего идентичные положения в каждой из четырех молекул. Для удобства выберем начало координат прямо на оси четвертого порядка. Тогда, если один тяжелый атом расположен в точке $xa + yb$, остальные должны распола-



гаться так, как показано на рис. А. Соответствующие векторы тяжелый атом — тяжелый атом равны

$$\begin{aligned} \mathbf{r}_{12} &= (x + y, y - x) & \mathbf{r}_{21} &= (-x - y, x - y) \\ \mathbf{r}_{13} &= (2x, 2y) & \mathbf{r}_{31} &= (-2x, -2y) \\ \mathbf{r}_{14} &= (x - y, x + y) & \mathbf{r}_{41} &= (y - x, -x - y) \\ \mathbf{r}_{23} &= (x - y, x + y) & \mathbf{r}_{32} &= (y - x, -x - y) \\ \mathbf{r}_{24} &= (-2y, 2x) & \mathbf{r}_{42} &= (2y, -2x) \\ \mathbf{r}_{34} &= (-x - y, x - y) & \mathbf{r}_{43} &= (x + y, y - x) \end{aligned}$$

плюс четыре нулевых вектора (от тяжелого атома до самого себя), которые будут лежать в начале координат.

Результирующая разностная паттерсоновская карта будет такой, как показано на фрагменте Б рисунка (для относительных значений x и y , приведенных на фрагменте А рисунка), где цифра рядом с каждым пиком дает его относительный вес. Заметим, что карта обладает той же поворотной осью симметрии четвертого порядка, что и породившая ее структура. Сосредоточимся на нижнем правом квадранте и сравним результат с рис. 13.36, А. Обратим внимание на пик с двойным весом около вертикальной оси. Этот пик должен соответствовать почти вертикальному вектору, при помощи которого образуются две стороны квадрата из тяжелых атомов в структуре. Пик с единичным весом (в правой нижней части рис. 13.36, А) отвечает диагонали квадрата. Около горизонтальной оси виден «хвост» от пика, отвечающего вектору с двойным весом, расположенному в правом верхнем ква-

дранте карты. Таким образом, локализация тяжелых атомов в вершинах квадранта полностью согласуется с наблюдаемой разностной паттерсоновской картой. Как только векторы идентифицированы, их положения дают значения x и y и, следовательно, действительные положения тяжелых атомов.

Для читателя было бы очень полезным проанализировать разностную карту ртутного производного на рис. 13.36,Б, а затем, пользуясь обеими картами, попытаться объяснить результаты, показанные на рис. 13.36,В, для двойного ртутно-платинового производного.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДАННЫХ О ПОЛОЖЕНИИ ТЯЖЕЛЫХ АТОМОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ФАЗ СТРУКТУРНОГО ФАКТОРА

Зная природу каждого тяжелого атома и его координаты, можно рассчитать фазу и амплитуду его вклада в структурный фактор с помощью уравнения (13.70). Этот расчет дает F_H . Структурный фактор тяжелоатомного изоморфного производного F_{PH} должен быть связан со структурными факторами исходного кристалла F_P и тяжелого атома F_H соотношением (13.102).

Как только найдено положение тяжелого атома, F_H определяется полностью. Однако измерить можно только структурные амплитуды $|F_{PH}|$ и $|F_P|$. Используя эти три величины, удастся ограничить фазу для белка лишь двумя возможными величинами (рис. 13.37,А). Допустимые значения F_P лежат на окружности радиуса $|F_P|$ с центром в начале координат. Возможные значения F_{PH} будут лежать на окружности радиуса $|F_{PH}|$, но, чтобы удовлетворить уравнению (13.102), центр этой окружности должен быть смещен из начала координат на известный вектор F_H . Тогда две соответствующие окружности пересекутся в двух точках. В каждой из этих точек, отвечающих фазам ϕ_a и ϕ_b , выполняются условия, налагаемые уравнением (13.102).

Наиболее распространенный способ разрешения остающейся неопределенности фазы — использовать второе тяжелоатомное изоморфное производное. Оценивают положения тяжелых атомов, рассчитывают $F_{H'}$, а затем используют аналог уравнения (13.102): $F_{PH'} = F_P + F_{H'}$. Процедуру выбора фазы F_P повторяют снова путем сравнения $|F_{PH'}|$ и $|F_P|$ с использованием известной величины $F_{H'}$ (рис. 13.37,Б). В идеальном случае одна из двух точек пересечения окружностей будет соответствовать либо ϕ_a , либо ϕ_b , а другая даст еще одно какое-то значение ϕ_c . Таким образом, поскольку F_P может иметь только одну фазу, ею однозначно должен быть угол, общий для двух изоморфных производных.

Однако экспериментальные данные несовершенны; положение тяжелых атомов тоже нельзя определить абсолютно точно. Поэтому точки пересечения окружностей для двух разных изоморфных производных могут не совпадать. В таком случае для устранения неоднозначности обычно желательно иметь дополнительные изоморфные производные, с помощью которых можно повысить точность оценки фаз и исключить кажущееся согласие, которое является случайным. На самом деле чем больше имеется производных, тем вероятнее более точный выбор фазовых углов. Статистические методы выбора наилучших фазовых оценок с помощью множества изоморфных производных описаны Бланделом и Джонсоном (Blundell, Johnson, 1976).

При наличии оценок фаз F_P можно воспользоваться уравнением (13.93) и, вводя в него измеренные структурные амплитуды $|F_P(h, k, l)|$ и вычисленные фазы $\phi_{h,k,l}$, рассчитать карту электронной плотности макромолекулы. Однако в большинстве случаев такая карта не будет очень точной, если предварительно не были уточнены положения тяжелых атомов.

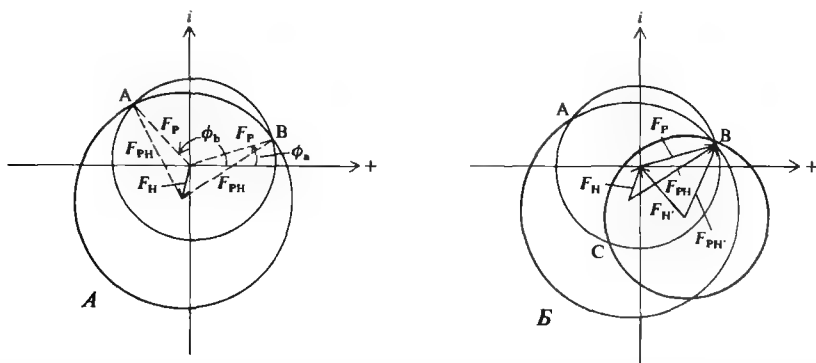


РИС. 13.37. Определение фаз методом изоморфного замещения. Так же, как и на рис. 13.34, структурные факторы даны на комплексной плоскости. *А*. Одно тяжелоатомное производное. Окружность с радиусом F_P представляет исходный кристалл, для которого интенсивности измерены, а фазы неизвестны. Окружность с радиусом F_{PH} представляет изоморфный кристалл, содержащий тяжелый атом; интенсивности измерены, фазы неизвестны. Векторы F_H рассчитывается по данным о положении тяжелого атома, которое было определено из разностного паттерсоновского синтеза. Поскольку F_H вычисляется, то известны и его фаза, и амплитуда. F_P , F_H и F_{PH} будут удовлетворять уравнению (13.102), если центр окружности F_P лежит в начале координат, а центр окружности F_{PH} находится на конце вектора F_H . Поэтому две окружности смещены одна относительно другой и пересекаются в двух точках *A* и *B*. Эти точки определяют два возможных значения фазы F_P : ϕ_a и ϕ_b . *Б*. Добавление второго тяжелоатомного производного. Его амплитуде рассеяния соответствует окружность (изображена в цвете) с радиусом F_{PH} , и центром на конце вектора F_H , который рассчитывается по известному положению тяжелого атома. Эта окружность также пересекает окружность F_P в двух точках *B* и *C*. Поскольку одна точка пересечения (*B*) та же, что и в случае первого тяжелого атома, единственным значением фазы F_P , согласующимся с обоими производными, является ϕ_b . (Eisenberg D. In: The Enzymes, 3rd ed., vol. 1, ed. P.D. Boyer, New York, Academic Press, 1970, p. 1.).

ОЦЕНКИ ФАЗ ПРИ НАЛИЧИИ ЦЕНТРА СИММЕТРИИ

Допустим, что мы в состоянии приготовить только одно изоморфное производное. Прогноз в этом случае не абсолютно безнадежен. Очень часто оказывается, что проекция кристалла на плоскость обладает центром симметрии. Преимущества центросимметричных проекций при вычислении амплитуды F_H были описаны ранее. Теперь покажем, как такие проекции помогают при вычислении фазы F_P . Заметим, что для расчета проекций нужен лишь один слой обратного пространства, и задача определения структуры в таком случае двумерна.

Если существует центр симметрии, то фазы могут равняться либо 0, либо π и, следовательно, единственной остающейся для F_P неопределенностью является знак. Измеряемое изменение амплитуды для данного дифракционного пятна, возникающее вследствие тяжелоатомного изоморфного замещения, есть

$$\Delta F = |F_{PH}| - |F_P| \quad (13.106)$$

На рис. 13.35 показаны все возможные комбинации F_{PH} , F_P и F_H . При сравнении знака ΔF (величины, которая измеряется) со знаком F_H (величины, вычисляемой по известным положениям тяжелого атома) возникает интересное обобщение. За исключением двух редких случаев перекреста, знак F_P должен быть положительным ($\phi = 0$), если ΔF и F_H име-

ют одинаковые знаки. Если же их знаки противоположны, то знак F_p отрицателен ($\phi = \pi$).

Таким образом, даже с одним изоморфным производным можно правильно рассчитать почти все фазы пентросимметричной проекции структуры. Затем с помощью синтеза Фурье [точная аналогия уравнения (13.93)] можно рассчитать электронную плотность проекции $\rho(x, y)$. Кристаллографы часто пользуются проекциями, так как их можно рассчитать на ранних стадиях анализа, и двумерное суммирование требует гораздо меньше счетного времени, чем трехмерное. Однако необходимо помнить, что проекция не определяет однозначно структуру, от которой она возникла.

УТОЧНЕНИЕ ПОЛОЖЕНИЙ ТЯЖЕЛЫХ АТОМОВ, ПОЛУЧАЕМОЕ ПОСЛЕ ОЦЕНКИ ФАЗ ДЛЯ ИСХОДНОГО КРИСТАЛЛА

Если бы были известны фазы, соответствующие каждому дифракционному пятну от исходного кристалла и от тяжелоатомного изоморфного производного, можно было бы рассчитать карту электронной плотности и того, и другого, пользуясь уравнением (13.39). Однако иногда полезно найти лишний раз положения тяжелых атомов. Это можно сделать с помощью разностного фурье-синтеза:

$$\begin{aligned} \Delta\rho(x, y, z) &= \rho_{PH} - \rho_P = \\ &= (1/V) \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} \times \\ &\times [|F_{PH}(h, k, l)| e^{i\phi_P(h, k, l)} - |F_P(h, k, l)| e^{i\phi_P(h, k, l)}] e^{-2\pi i(hx + ky + lz)} \quad (13.107) \end{aligned}$$

Здесь каждый структурный фактор явно выражен в виде амплитудной и фазовой составляющих. Амплитуды $|F_{PH}|$ и $|F_P|$ являются измеряемыми величинами. Для *обеих* амплитуд используются фазы исходного кристалла ϕ_P , оцениваемые так, как было показано выше.

В принципе подобным же образом можно было бы оценить и фазы для производного ϕ_{PH} и использовать их в уравнении (13.107); однако это привело бы к кое-каким трудностям. Результаты фурье-синтезов определяются прежде всего фазами, а не амплитудами (см. рис. 13.28). Фазы, рассчитанные для производного, содержали бы с большим весом вклад от тяжелых атомов. В результате синтеза Фурье мы просто вернулись бы к тем же положениям тяжелых атомов, с которых начинали, и ничего бы не добились. Даже оценки фаз для исходного кристалла ϕ_P сильно «загрязнены» фазами для тяжелых атомов.

На практике, когда есть несколько тяжелоатомных производных, лучше всего использовать фазы для исходного кристалла, оцененные при помощи одного или нескольких производных, для того чтобы рассчитать разностный синтез Фурье по другим производным; такие синтезы называются перекрестно-фазовыми разностными синтезами. На рис. 13.38 представлен пример для тех же производных цитохрома с, которые мы уже рассматривали. Атомы Pt и Hg ясно выступают на слабом фоне. Однако видимые их положения еще не совпадают с истинными положениями в кристалле.

УТОЧНЕНИЕ СТРУКТУРНОЙ МОДЕЛИ ПО МЕТОДУ НАИМЕНЬШИХ КВАДРАТОВ

При расчете картины рентгеновского рассеяния используются некоторые подгоночные параметры. В ходе уточнения по методу наименьших квадратов делается попытка найти

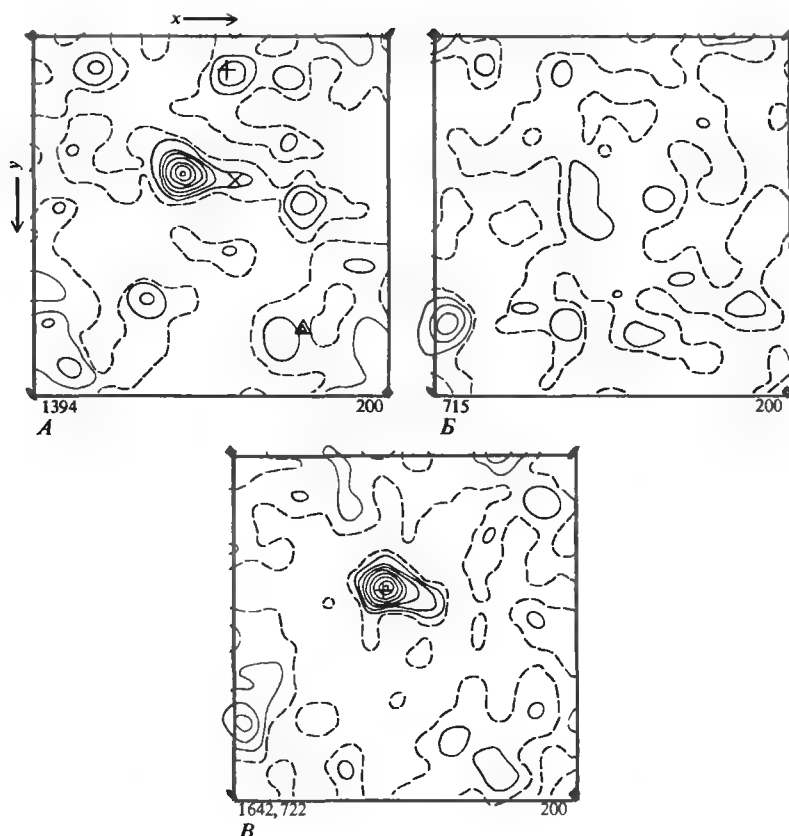


РИС. 13.38. Карты перекрестно-фазового разностного синтеза Фурье, рассчитанные для тех же кристаллов цитохрома с, к которым относится рис. 13.36. Все три карты нарисованы в одном масштабе; интервалы между контурами указаны в нижних правых углах; высоты главных пиков указаны слева внизу. Начало координат — в левом верхнем углу; в каждом направлении показана только половина элементарной ячейки. *А.* Разностная карта, рассчитанная по амплитудам для Pt-производного и фазам для исходного белка, определенным с помощью Hg-производного. Истинное положение платины обозначено косым крестиком, сомнительное положение — плюсом, ложное положение — треугольником. *Б.* Разностная карта, рассчитанная по амплитудам для Hg-производного и фазам для исходного белка, определенным с помощью Pt-производного. Атом Hg расположен слева внизу. *В.* Карта для двойного производного, рассчитанная при использовании фаз для белка, полученных с помощью нескольких наборов металлических производных. [Dickerson R.E. et al., J. Mol. Biol., 29, 77 (1967).]

такие значения этих параметров, которые минимизировали бы различие между наблюдаемыми амплитудами структурных факторов и амплитудами, рассчитанными для выбранной модели структуры. Сначала мы проиллюстрируем это в общем случае, а затем рассмотрим приложение к случаю тяжелоатомного изоморфного замещения. Экспериментально измеряют амплитуды структурных факторов $|F_{\text{эксп}}|$. Рассчитанные значения $|F_{\text{рассч}}|$ обычно получают из уравнения (13.70). Они зависят от всех структурных параметров пробной модели—координат x , y и z и атомного номера каждого атома.

Кроме того, в случае структур с высоким разрешением существует еще один эффект, который необходимо учитывать. Даже в кристалле атомы не жестко фиксированы в пространстве. Они колеблются, и амплитуды этих колебаний различны для разных атомов. Можно показать, что в случае изотропного теплового движения атомный рассеивающий фактор будет иметь вид $f = f_0 e^{-\beta |\mathbf{S}|^2/4}$, где $\mathbf{S}$ — вектор рассеяния, а величина β связана со среднеквадратичной амплитудой атомных колебаний $\langle \mu \rangle$ соотношением $\beta = 8\pi^2 \langle \mu \rangle^2$. Это соотношение вводит еще один параметр. О величине температурного фактора β можно судить, зная тип атома, но при самом строгом определении структуры он тоже будет переменной величиной. Более того, реальные колебания анизотропны, т.е. их следует представлять температурным эллипсоидом, определяемым шестью параметрами. Таким образом, для каждого атома требуется в общей сложности от трех до девяти параметров P_j , а для всей асимметричной единицы количество требуемых параметров n становится очень большим.

При уточнении по методу наименьших квадратов следует так подобрать эти параметры, чтобы стала минимальной разница между наблюдаемыми и рассчитанными амплитудами структурных факторов. Практически минимизируется следующая величина:

$$D = \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} W_{hkl} [F_{\text{эксп}}(h, k, l) - \kappa F_{\text{расч}}(h, k, l)]^2 \quad (13.108)$$

где W_{hkl} — весовой множитель, с помощью которого оценивается надежность данной экспериментальной или расчетной точки, а κ — масштабный коэффициент. Для каждого параметра P_j мы устанавливаем условие $\partial D / \partial P_j = 0$. Это приводит к n уравнениям для n неизвестных параметров. Одновременное решение этих уравнений обеспечивает условие минимальности суммы квадратов разностей (13.108).

Пример того, как подобные вычисления производятся в матричном виде, дается в гл. 8 (разд. 8.1). Важным моментом является то, что матрица размером $n \times n$ должна быть обращена. В случае линейных уравнений достаточно одного обращения матрицы. Однако уравнения, которые получаются при дифференцировании суммы (13.108), нелинейны относительно неизвестных параметров. Поэтому необходимо использовать итерационный метод. Он включает в себя обращение матрицы $n \times n$, вычисление получающихся в результате параметров, новый ввод их в уравнения и повторение процесса обращения матрицы. Эта процедура повторяется снова и снова до тех пор, пока параметры не сойдутся к значениям, которые минимизируют D .

МЕТОД НАИМЕНЬШИХ КВАДРАТОВ ДЛЯ УТОЧНЕНИЯ ПОЛОЖЕНИЙ ТЯЖЕЛЫХ АТОМОВ

В методе изоморфного замещения $|F_P|$ и $|F_{PH}|$ — измеряемые величины, F_H — величина, вычисленная из оценок положения тяжелых атомов, а ϕ_P — величина, рассчитанная так, как было описано ранее. Если бы все эти результаты были совершенно точны, то F_{PH} , F_P и F_H образовывали бы треугольник, как показано на рис. 13.34. Однако ввиду ошибок треугольник обычно не замыкается.

Вычисляя структурный фактор, ожидаемый для тяжелоатомных производных, имеем

$$F_{PH}^{\text{расч}} = |F_H| e^{i\phi_H} + |F_P| e^{i\phi_P} \quad (13.109)$$

Чтобы уточнить положения тяжелых атомов, попытаемся минимизировать разницу между амплитудой этого вычисленного структурного фактора и наблюдаемой амплитудой. Используемое уравнение, аналогичное (13.108), имеет вид

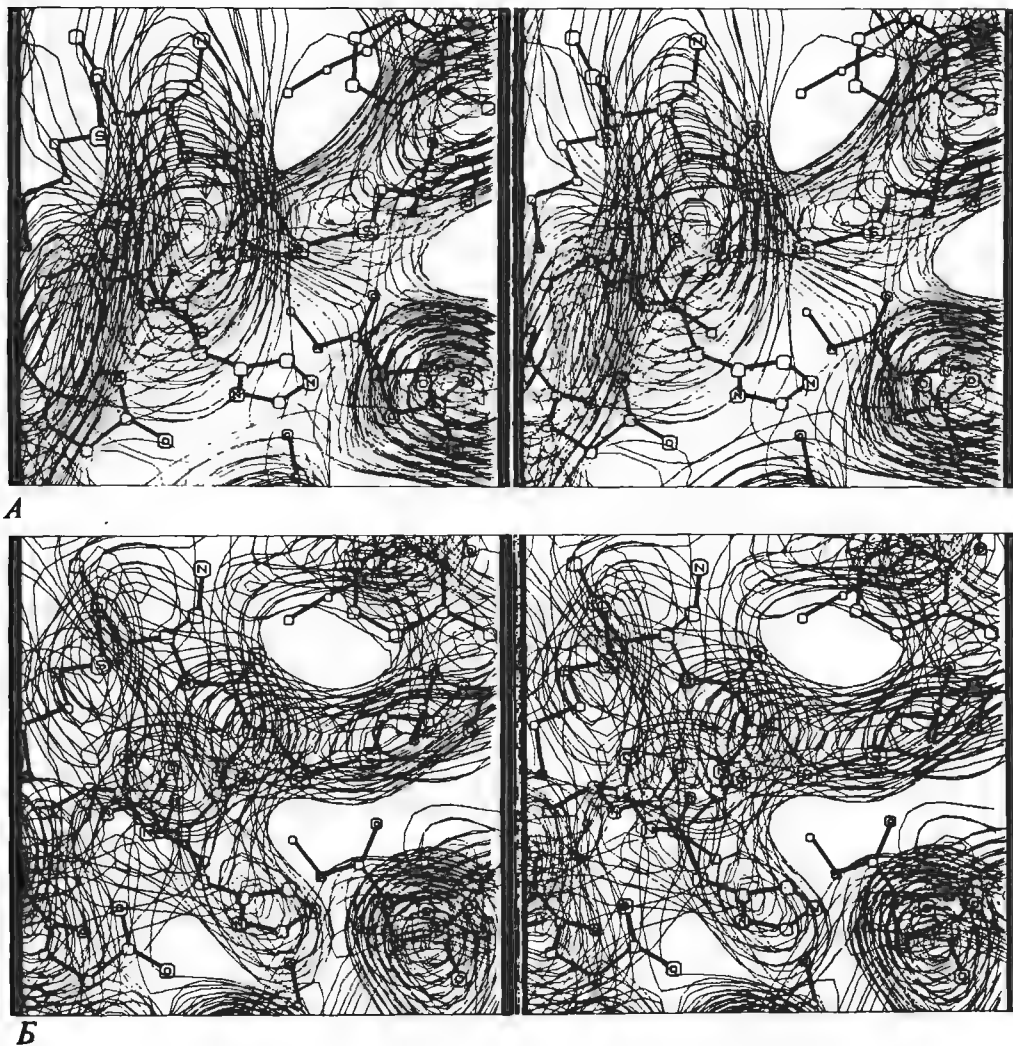
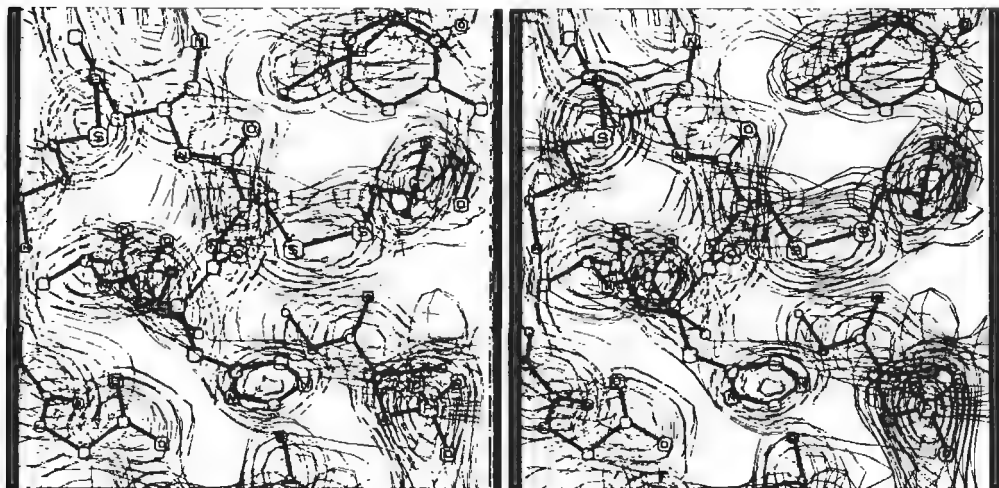
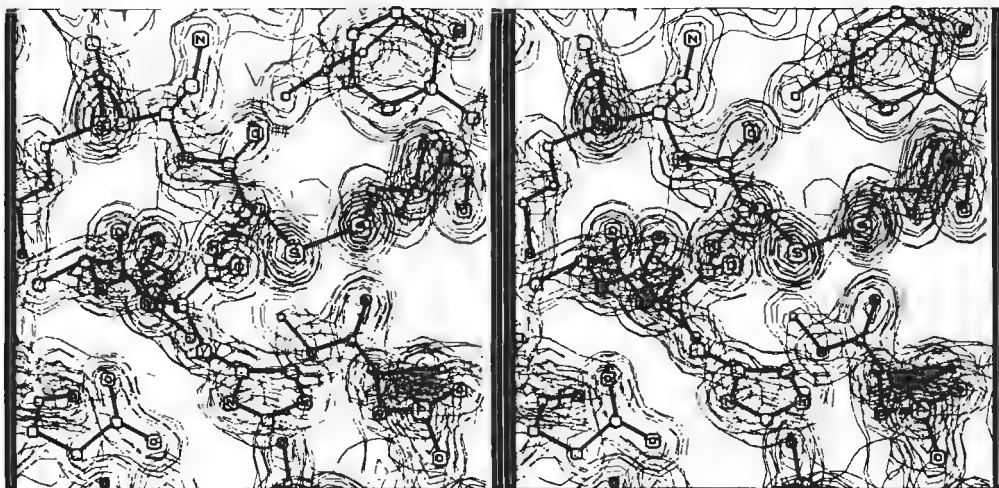


РИС. 13.39. Карты электронной плотности белка при различном разрешении. Карты рассчитаны по измеренным интенсивностям и вычисленным фазам. Исследуемый белок — диизопропилфторфосфатное производное трипсина быка. Вид вдоль оси у активного центра. На каждой карте повторяется скелетная модель *наилучшей* окончательной структуры; обратите внимание на фосфат внизу справа и на гистидин активного центра, расположенный ниже центра карты; над ними располагается дисульфидная связь S—S. А. Карта при разрешении 6 Å; изображены контуры электронной плотности, начиная с $0,05 \text{ e} \cdot \text{Å}^{-3}$, с шагом между последовательными контурами $0,05 \text{ e} \cdot \text{Å}^{-3}$. Б. Разрешение 4,5 Å; контур минимальной электронной плотности $0,10 \text{ e} \cdot \text{Å}^{-3}$, межкунтурный шаг



В



Г

$0,10 e \cdot \text{\AA}^{-3}$. В. Разрешение $3,0 \text{\AA}$, контур минимальной электронной плотности $0,35 e \cdot \text{\AA}^{-3}$, межконтурный шаг $0,30 e \cdot \text{\AA}^{-3}$. Г. Разрешение $1,5 \text{\AA}$; контур минимальной электронной плотности $0,50 e \cdot \text{\AA}^{-3}$, межконтурный шаг $0,50 e \cdot \text{\AA}^{-3}$. Все карты представлены в виде стереопар (John L. Chambers). [Дальнейшие детали изложены в неопубликованной диссертации (Chambers J.L., Ph. D. Thesis, Calif. Institute of Technology, 1977).]

$$D = \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} W_{hkl} [|F_{\text{PH}}(h, k, l)| - |F_{\text{PH}}^{\text{рассч}}(h, k, l)|]^2 \quad (13.110)$$

Эта минимизация выполняется путем варьирования положений тяжелых атомов и температурных параметров.

Такой подход не обязательно самый лучший для каждого кристалла, и Бланделл и Джонсон обсуждают альтернативные подходы (Blundell, Johnson, 1976).

Как только уточнены положения тяжелых атомов, их используют для расчета окончательного набора фаз для исходного кристалла. Затем, наконец, наступает стадия фурье-синтеза полной структуры в соответствии с уравнением (13.93).

АНОМАЛЬНАЯ ДИСПЕРСИЯ В ТЯЖЕЛЫХ АТОМАХ

В кристаллографии белков и нуклеиновых кислот все более широкое применение находит еще один метод, использующий присутствие в структуре тяжелых атомов. Это метод аномальной дисперсии. Аномальная дисперсия проявляется тогда, когда частота используемого рентгеновского излучения приближается к частоте излучения, поглощаемого атомом. На практике этот метод наиболее полезен для атомов более тяжелых, чем атом серы.

До сих пор мы рассматривали атомный рассеивающий фактор как величину действительную. На самом деле f — величина комплексная, так как фазовый сдвиг при рассеянии не обязательно равен целому или полуцелому числу колебаний:

$$f(S) = f_0(S) + if'_0(S) \quad (13.111)$$

Член f'_0 существен только тогда, когда частота рентгеновского излучения близка к частоте, характерной для атомного поглощения. Он связан с коэффициентом поглощения данного атома в этой области частот.

Одним из выражений того факта, что величина $f(S)$ считается действительной, является закон Фриделя. Следуя уравнению (13.18), для атомов исходного кристалла, не «участвующих» в аномальной дисперсии, можно написать

$$|F_P(h, k, l)| = |F_P(-h, -k, -l)| \quad (13.112)$$

Однако для кристаллов, содержащих тяжелые атомы, это соотношение перестает быть верным. Нарушение закона Фриделя можно использовать несколькими путями (Blundell, Johnson, 1976). Пусть, например, используется рентгеновское излучение с двумя различными частотами, причем для одной из них наблюдается аномальная дисперсия, а для другой — нет. Разница в интенсивностях рассеяния представила бы аномальное рассеяние, которое будет наблюдаться только на тяжелых атомах. В этом случае возможен расчет фаз с помощью метода, аналогичного описанным выше изоморфным методам.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ КАРТЫ ЭЛЕКТРОННОЙ ПЛОТНОСТИ

Ниже мы опишем некоторые типичные этапы определения кристаллической структуры белка (рис. 13.39). Предположим, что были приготовлены и исследованы несколько изоморфных производных. Изоморфное замещение было проведено для оценки фаз всех $F_P(h, k, l)$ и после использования этих фаз и всех прочих данных — для расчета (с определенным разрешением) карты электронной плотности. Выбранное разрешение будет зависеть от качества реального кристалла и степени изоморфности производных.

Улучшение разрешения сопряжено с существенным увеличением набора экспериментальных данных, и для того, чтобы затраченные усилия не пропали даром, значения фаз должны быть очень надежными.

Если в результате расчета получается карта с разрешением около $6 \text{ \AA}$, то макромолекула предстает на ней обыкновенно в виде сгустков электронной плотности; типичный пример приведен на рис. 13.39, А. При этом разрешении обычно невозможно распознать скелет полимерной цепи белка или нуклеиновой кислоты.

Однако даже при разрешении $6 \text{ \AA}$ в карте электронной плотности содержится очень полезная информация. Можно получить представление о деталях формы макромолекулы, различить отдельные субъединицы или пустоты в структуре; так, α -спирали предстанут в виде отдельных стержней. При наличии помеченных тяжелым атомом лигандов или субстратов можно с помощью разностного синтеза Фурье определить места их связывания. Если найденные результаты окажутся разумными, то обычно стоит перейти к анализу с более высоким разрешением при условии, конечно, что экспериментальные данные, полученные при исследовании имеющихся производных, обладают достаточно высоким качеством.

При разрешении $3 \text{ \AA}$ уже можно увидеть скелет полимерной цепи (рис. 13.39, В). В случае белка боковые группы только достаточно крупных аминокислот проявляются как дискретные пики электронной плотности. При таком разрешении еще трудно сконструировать осмысленную модель молекулы. Но в случае нуклеиновых кислот двойные спирали проявляются довольно отчетливо.

При разрешении $2,5 \text{ \AA}$ видны почти все боковые группы белковой молекулы. Карбоксильная группа каждого пептида имеет вид выступа на основной цепи, так что можно определить ориентацию каждой пептидной плоскости.

Если известна последовательность аминокислот, можно начинать строить модель белка. Для этого существуют разные методы. В простейшем из них используется Ричард-бокс, где с помощью полупрозрачного зеркала изображение проволочной модели совмещается со сложенными стопкой сечениями электронной плотности, нарисованными на тонких пластинах оргстекла. Затем с модели считываются координаты атомов. В новейших методах используется машинный поиск, когда пептидную цепь «подстраивают» под наиболее вероятный непрерывный ход электронной плотности. Заметим, что при обоих подходах существенным образом используется предположение, что геометрия пептидной цепи (за исключением двугранных углов) известна. Это сильно отличается от рентгеноструктурного анализа малых молекул с высоким разрешением, где длины валентных связей и валентные углы определяются *de novo*.

Первоначальная подгонка пептидной цепи к карте электронной плотности с разрешением $2,5\text{--}3,0 \text{ \AA}$ не будет очень точной. Многие группы не совпадают в точности с пиками электронной плотности, которые предположительно их представляют (см. типичный пример на рис. 13.39, В). Однако предварительную модель можно теперь использовать в одном или нескольких циклах уточнения. Например, при уточнении в прямом пространстве модель подгоняют таким образом, чтобы попытаться минимизировать разницу между плотностью $\rho(x, y, z)$, вычисленной по рентгеновским данным, и плотностью, рассчитанной для модели. Кроме того, можно воспользоваться методом фурье-уточнения или методом наименьших квадратов.

При более высоком разрешении начинают просматриваться отдельные атомы (см., например, карту с разрешением $1,5 \text{ \AA}$ на рис. 13.39, Г). Теперь уже действительно можно идентифицировать боковые группы многих аминокислот прямо по карте электронной плотности. В самом деле, структурно-кристаллографические исследования выявили ряд серьезных ошибок в предшествующих определениях аминокислотных последовательностей. Чем больше боковых групп удастся увидеть, тем более точную модель можно по-

строить и в свою очередь тем вероятнее, что дополнительное уточнение карты электронной плотности приведет к дальнейшим улучшениям.

УЧЕТ ЭНЕРГИИ БЕЛКОВЫХ КОНФОРМАЦИЙ ПРИ ИНТЕРПРЕТАЦИИ КАРТЫ ЭЛЕКТРОННОЙ ПЛОТНОСТИ

Кристаллографы серьезно озабочены вопросом, насколько данные конформационного анализа белков могут быть использованы в процессе определения кристаллических структур. Как показано в гл. 5, мы с достаточной уверенностью можем судить, какие области двугранных углов чаще всего встречаются у пептидов. Нам многое известно о силах, которые определяют взаимодействия валентно-несвязанных остатков. При данной пробной структуре, определенной с помощью фурье-синтеза, знание этих конформационных свойств можно было бы использовать — путем минимизации энергии — для расчета структуры, лучше согласующейся с известной нам термодинамической информацией.

М.Левитт и Р.Даймонд (M. Levitt, R. Diamond) показали, что последовательные циклы фурье-уточнения и уточнения конформационной энергии могут быть синергическими и приводить к тому, что весь процесс «сойдется» на структуре, лучше удовлетворяющей всем требованиям. Это вполне разумно. Сам факт образования кристалла предполагает, что всему кристаллу должен соответствовать минимум свободной энергии. С другой стороны, можно использовать данные о конформационных энергиях не для того, чтобы попытаться получить структуру с минимальной энергией, а как раз для того, чтобы понять, куда надо слегка сместить атомы в пробной структуре. Смещение, которое одновременно улучшает положение атома на рассчитанной карте электронной плотности и понижает конформационную энергию, вероятно, и должно быть шагом в правильном направлении.

РАЗНОСТНЫЙ ФУРЬЕ-СИНТЕЗ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МАКРОМОЛЕКУЛЫ С ЛИГАНДОМ

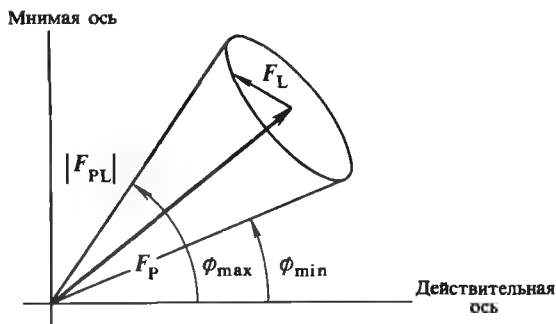
Разностный фурье-синтез крайне полезен при сравнении двух структур. Например, разностная фурье-карта изоморфного производного и исходного белка должна, как уже говорилось, содержать не что иное, как электронную плотность добавленных тяжелых атомов. Аналогичным образом разностный фурье-синтез применялся для определения мест присоединения субстрата или лиганда к белку. Здесь идея состоит в том, чтобы измерить дифракционные интенсивности, отвечающие белку с присоединенным к нему лигандом. Затем по этим измеренным интенсивностям и фазам, рассчитанным для чистого белка без лиганда, строится разностная фурье-карта. Результат может дать как раз электронную плотность связанного лиганда плюс некую разность электронной плотности, возникающую из-за изменений в структуре белка под действием присоединения лиганда. Естественно, такой метод эффективен лишь в том случае, когда последние разности невелики.

Метод разностного фурье-синтеза достаточно хорош для определения положения лиганда, поскольку его присутствие относительно мало меняет фазу большинства структурных факторов. По аналогии с уравнением (13.102) можно написать

$$F_{PL} = F_P + F_L \quad (13.113)$$

где индекс PL отвечает комплексу исходный белок — лиганд, а F_L — структурный фактор лиганда. Рис. 13.40 иллюстрирует это векторное уравнение графически. Здесь F_P и $|F_{PL}|$ известны. При условии, что $F_L < F_P$ и $F_L < F_{PL}$, возможные значения F_{PL} должны занимать небольшую область фазовых углов. Таким образом, в первом приближении хорошей оценкой ϕ_{PL} является фаза ϕ_P .

РИС. 13.40 Влияние добавленного лиганда на наблюдаемые структурные факторы. Предполагается, что структурный фактор для исходного кристалла F_P известен. Тогда, поскольку модуль структурного фактора лиганда $|F_L|$ мал, фаза F_P служит хорошим приближением для фазы структурного фактора комплекса белка с лигандом F_{PL} .



По аналогии с уравнением (13.107) можно рассчитать разностную фурье-карту:

$$\Delta\rho(x, y, z) = (1/V) \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} [|F_{PL}(h, k, l)| - |F_P(h, k, l)|] e^{i\phi_P(h, k, l)} e^{-2\pi i(hx + ky + lz)} \quad (13.114)$$

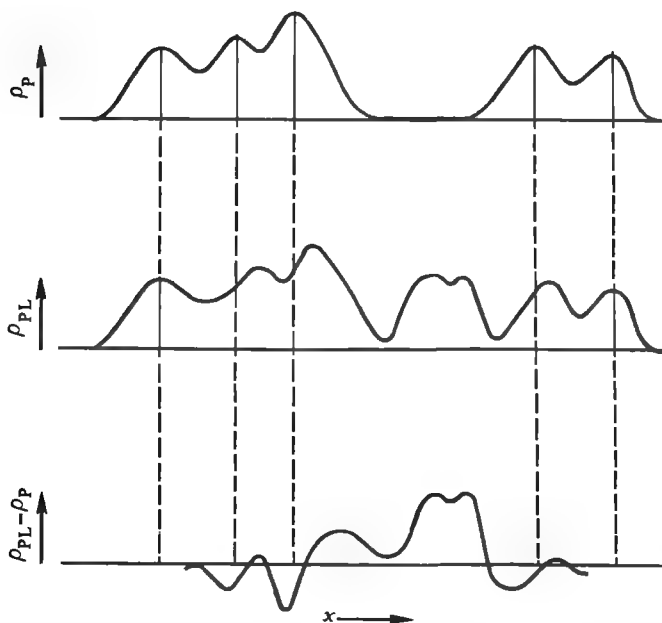


РИС. 13.41. Использование разностного синтеза Фурье при изучении связывания лиганда. Такой синтез можно использовать при определении мест связывания лиганда и возможных конформационных изменений, сопровождающих присоединение лиганда к белку. На рисунке приведены схематические одномерные изображения карты электронной плотности исходного белка (ρ_P), карты, которая получилась бы в результате решения структуры комплекса белка с лигандом (ρ_{PL}), и карты разностного синтеза Фурье ($\rho_{PL} - \rho_P$), которую можно рассчитать относительно простым образом (см. текст). Отметим, что сами по себе атомы лиганда просто увеличивают электронную плотность, тогда как перемещения атомов белка дают соседствующие пики и провалы в картине разностного синтеза. (Blundell T.L., Johnson L.N. Protein Crystallography, London, Academic Press, 1976.)

На этой карте появятся пики, соответствующие расположению связанного лиганда. На ней также обозначатся соседние положительные и отрицательные области электронной плотности, которые соответствуют смещению атомов под действием присоединения лиганда. Рис. 13.41 иллюстрирует это схематически в случае одномерного разностного синтеза Фурье.

Наглядное подтверждение применимости разностной фурье-карты при представлении структуры связанного лиганда можно найти, исследуя центросимметричную проекцию. Истинная структура связанного лиганда определяется выражением

$$\rho_L(x, y, z) = (1/V) \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} |F_L(h, k, l)| e^{i\phi_L(h, k, l)} e^{-2\pi i(hx + ky + lz)} \quad (13.115)$$

Нам надо знать, насколько хорошо $|F_L| e^{i\phi_L}$ аппроксимируется в уравнении (13.114) величиной $[|F_{PL}| - |F_P|] e^{i\phi_P}$. В центросимметричном случае, если учесть, что $|F_L|$ мало, уравнение (13.114) выполняется строго; в этом можно убедиться, применяя те же аргументы, что и при обсуждении рис. 13.35. В общем случае известно, что уравнение (13.114) правильно описывает электронную плотность лиганда, за исключением того, что все пики имеют высоту, равную половине правильной высоты, и что на карте будет присутствовать некоторый «шум».

Многое из того, что мы знаем о структуре активных центров ферментов, известно нам благодаря расчету разностных синтезов Фурье для кристаллов, содержащих связанные субстраты или связанные ингибиторы. Существование такого метода означает, что во многих случаях определение структуры макромолекулярного кристалла является не столько завершением огромной работы, сколько отправной точкой при исследовании функций макромолекул.

Краткие выводы

Рассеяние рентгеновских лучей атомом зависит от его положения в пространстве и от числа имеющихся у него электронов. Рентгеновское рассеяние от ряда атомов можно рассчитать путем суммирования вкладов от отдельных атомов. Периодичность рядов идентичных атомов приводит к тому, что заметное рассеяние наблюдается лишь при очень ограниченном наборе геометрий эксперимента. При рассмотрении рядов молекул подход должен быть таким же, как при рассмотрении рядов атомов. Кристалл — трехмерная периодическая решетка, состоящая из элементарных ячеек, размноженных в пространстве. Вершины ячеек определяют кристаллическую решетку. Периодичность этой трехмерной решетки ограничивает наблюдение рассеяния дискретным набором геометрий, которому соответствует обратная решетка кристалла.

Рентгеновское рассеяние можно описать с помощью фурье-преобразования электронной плотности объекта, в котором оно наблюдается. Таким образом, если бы мы могли измерить и фазу, и амплитуду рассеянного излучения, то можно было бы прямо воспроизвести структуру с помощью обратного преобразования Фурье. К сожалению, измерению поддаются лишь интенсивности. В принципе картина интенсивностей рассеяния содержит достаточно информации для того, чтобы восстановить структуру породившей ее системы, но эту информацию не столь легко интерпретировать. Обратное фурье-преобразование интенсивности рассеяния называется функцией Паттерсона. Это карта всех межатомных векторов. Таким образом, если в структуре имеется n атомов на элементарную ячейку, функция Паттерсона будет содержать n^2 векторов на элементарную ячейку.

Определение структуры макромолекулярного кристалла проводится обычно методом множественного изоморфного замещения. Сначала получают производные исходного кристалла, содержащие тяжелый металл, а затем сравнивают интенсивности рассеяния от исходного кристалла и от производных. Разностная паттерсоновская карта, рассчитанная прямо по интенсивностям, выявляет векторы, которые связывают между собой тяжелые атомы. Это позволяет произвести предварительную оценку положения последних. Используя эти данные, а также разницу между интенсивностями рассеяния от исходного кристалла и от производных, можно оценить фазу рассеянного излучения. При наличии такой оценки можно более точно определить положения тяжелых атомов. Если необходимо, эта процедура повторяется или применяются другие методы уточнения. В конце концов получаются фазы, достаточно точные для того, чтобы использовать их в комбинации с измеренными интенсивностями и рассчитать структуру.

Задачи

13.1. Рассчитайте структурный фактор для цепочки тождественных атомов, изображенной на рис. 13.42, и сравните результат с вычислениями, приведенными в основном тексте для подобных систем. Атомы изображены кружками, узлы решетки точками.

13.2. Подсчитайте интенсивности рассеяния для бесконечного двумерного кристалла из трехатомных молекул, изображенного схематически на рис. 13.43, где $|\mathbf{a}| = R$ и $|\mathbf{b}| = 4R$. Можно положить, что для центрального атома каждой молекулы атомный фактор рассеяния вдвое больше, чем для других двух атомов. Зависимость f от S следует пренебречь. Нужно показать, что распределение интенсивности по обратной решетке таково: она постоянна для всех значений h , но периодически меняется с изменением k так, что наибольшие значения наблюдаются для $k = 0, 4, 8, \dots$ и наименьшие — для $k = 2, 6, 10, \dots$ **Указание:** рассчитайте обратную решетку; рассчитайте рассеяние от одной молекулы, помещенной в начало координат; затем воспользуйтесь понятием свертки для расчета структурного фактора кристалла; наконец, возведите в квадрат амплитуду и получите интенсивность. (Это вариант задачи, предложенной Б.Зиммом.)

13.3. Пользуясь векторной диаграммой, приведенной на рис. 13.34, выведите следующее выражение для разности между амплитудами структурного фактора для исходного кристалла (P) и для тяжелоатомного изоморфного производного (PH):

$$|F_{PH}| - |F_P| = |F_H| \cos(\phi_{PH} - \phi_H) - 2|F_P| \sin^2[(\phi_P - \phi_{PH})/2]$$

При каких условиях можно воспользоваться разницей в наблюдаемых интенсивностях для получения хорошей оценки амплитуды структурного фактора тяжелого атома $|F_H|$?

13.4. Нарисуйте молекулу, паттерсоновская карта которой изображена на рис. 13.44 (считайте все атомы одинаковыми). Если непонятно, как это сделать, то выберите сначала несколько произвольных маленьких молекул и постройте для них паттерсоновские карты. Пики с множественными весами обозначены на рисунке соответствующими цифрами, у остальных пиков — единичный вес.

13.5. Длина элементарной ячейки одномерного кристалла равна $4 \text{ \AA}$. Измеренные интенсивности рассеяния — без учета зависимости $f(S)$ от S — приведены в табл. 13.4. Можно приготовить «тяжелоатомное» изоморфное производное, для которого в элементарную ячейку добавляется один атом с рассеивающим фактором, равным 5; интенсивности для производного также приведены в табл. 13.4.

а. Попытайтесь найти положение тяжелого атома с помощью разностного синтеза



РИС. 13.42. Периодическая цепочка атомов.

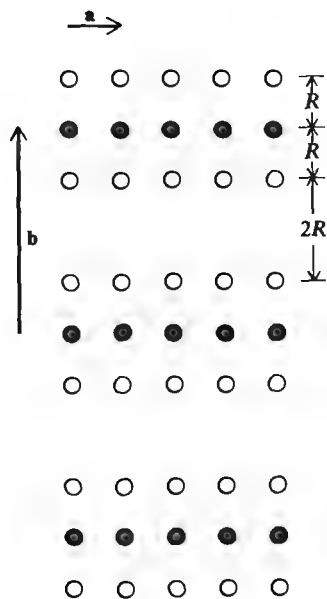


РИС. 13.43. Двумерная кристаллическая решетка.

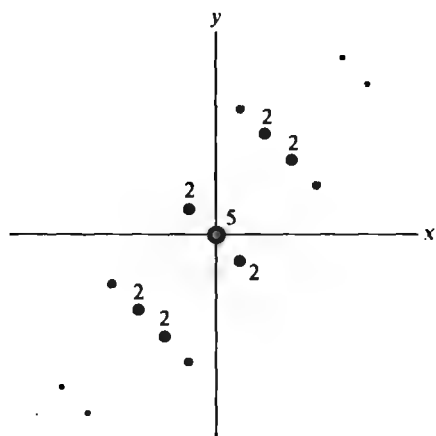


РИС. 13.44. Паттерсоновская карта.

Таблица 13.4

ИЗМЕРЕННЫЕ ИНТЕНСИВНОСТИ
РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ (к задаче 13.5)

h	$ F_p(h) ^2$	$ F_{pH}(h) ^2$
0	49	144
1	5	20
2	25	0
3	5	20
4	49	144
5	5	20
6	25	0
7	5	20
.	.	.
.	.	.
.	.	.

Фурье, пользуясь тем, что $|F_H| \approx ||F_{pH}| - |F_p||$. Убедитесь в том, что следует рассматривать только дифракционные пятна с $h = 0, 1, 2, 3$. Предположите временно, что все фазовые члены равны $+1$, и проведите вычисления только для $x = 0, R/4, R/2$ и $3R/4$, где R — длина элементарной ячейки.

б. Поскольку результат предыдущего задания дает для возможных положений тяжелого атома два максимума интенсивности, рассчитайте вклад каждого из них в структурный фактор. Воспользуйтесь данными о фазах, вычисленными для каждого положения, и интенсивностями, полученными в предыдущей части, и повторите разностный синтез Фурье. Есть ли какие-нибудь улучшения?

в. Зная, что $|F_H| = 5$, воспользуйтесь методом изоморфного замещения, описанным в основном тексте, чтобы оценить фазы структурного фактора $F_p(h)$ для двух возможных положений тяжелого атома. Теперь, используя тот критерий, что $\rho(x)$ должно быть величиной действительной при всех x , выберите поочередно фазу из четырех возможных вариантов и проведите синтез Фурье по данным о $|F_p(h)|$ для определения структуры. Отметим, что каждый синтез дает одну и ту же структуру, за исключением изменений в начале координат элементарной ячейки и изменения положительного направления x .

ЛИТЕРАТУРА

Общая

- Blundell T.L., Johnson L.N.*, 1976. Protein Crystallography, London, Academic Press. [Прекрасная современная монография.]
- Dickerson R.*, 1964. X-ray analysis and protein structure. In: The Proteins, 2nd ed., vol. 2, ed. H. Neurath, New York, Academic Press, p.603
- Eisenberg D.*, 1970. X-ray crystallography and enzyme structure. In: The Enzymes, 3rd ed., vol. 1, ed. P.D. Boyer, New York, Academic Press, p.1
- Glusker J.P., Trueblood K.N.*, 1972. Crystal Structure Analysis: A Primer, London, Oxford Univ. Press. [Простая, понятная трактовка предмета.]

Специальная

- Fraser R.D.B., MacRae T.P.*, 1969. X-ray methods. In: Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry, part A, ed. S.J. Leach, New York, Academic Press.
- Guinier A.*, 1963. X-Ray Diffraction in Crystals, Imperfect Crystals and Amorphous Bodies, San Francisco W.H. Freeman and Company. [Применяется сложный математический аппарат.]
- Lipson H., Taylor C.A.*, 1958. Fourier Transforms and X-Ray Diffraction, London, G. Bell and Sons.
- Matthews B.W.*, 1974. Determination of molecular weight from protein crystals, J. Mol. Biol., **82**, 513.
- Stout G.H., Jensen L.M.*, 1968. X-Ray Structure Determination: A Practical Guide, New York, Macmillan.

Глава 14 Другие методы, использующие рассеяние и дифракцию

14.1. Рентгеновская дифракция в волокнах

Подходящие для рентгеноструктурного анализа кристаллы могут быть получены далеко не для всех макромолекул, представляющих биологический интерес. Длинные стержнеобразные молекулы, такие, как отдельные α -спирали или ДНК, не поддаются кристаллизации. Однако из концентрированных гелей, образующихся при осаждении таких молекул из раствора, можно механически вытягивать волокна, обладающие частичной упорядоченностью. На рис. 14.1 схематически представлена внутренняя структура нескольких типов волокон.

РЕНТГЕНОВСКОЕ РАССЕЯНИЕ ОТ ВОЛОКОН

Кристаллическое волокно представляет собой так называемую текстуру из микрокристаллов. Направление одной из осей у всех этих микрокристаллов одинаково, но относительно этого направления отдельные кристаллы могут быть повернуты на случайные углы (рис. 14.1, А). Картина рентгеновского рассеяния от такого волокна будет складываться из рассеяния от кристаллов, имеющих всевозможные азимутальные ориентации относительно фиксированной оси. Подобная картина эквивалентна рентгенограмме от вращающегося монокристалла, изображенной на рис. 13.29, А.

Рентгеновское рассеяние от одного микрокристалла описывается уравнением (13.65), которое можно записать в сокращенном виде:

$$F_{\text{сумм}} = F_m(\mathbf{S})F_L(\mathbf{S}) \quad (14.1)$$

Здесь $F_m(\mathbf{S})$ — молекулярный структурный фактор, или фурье-преобразование содержимого элементарной ячейки. $F_L(\mathbf{S})$ — «вырезающая» функция, обусловленная решеткой [см. уравнение (13.60)], или фурье-преобразование решетки. Интенсивность рассеяния, наблюдаемая от всего волокна, определяется величиной $\langle |F_{\text{сумм}}|^2 \rangle$, где угловые скобки означают усреднение по азимутальным ориентациям (по вращению) относительно одной из осей решетки. В принципе на таком образце можно получить достаточно данных для того, чтобы расшифровать его структуру, используя методы, описанные в гл. 13 для кристаллов. На практике, однако, это крайне трудно, так как при больших углах рассеяния происходит значительное перекрытие дифракционных пятен.

В *полукристаллическом волокне* продольная ось каждой стержнеобразной молекулы ориентирована вдоль направления вытягивания волокна. В направлении, перпендикулярном продольной оси, молекулы укладываются вместе таким образом, что образуют весьма регулярную решетку. Однако отдельные молекулы имеют случайные азимутальные ориентации относительно продольной оси волокна и случайные смещения вдоль этой оси (рис. 14.1, Б). Рентгеновское рассеяние от такого образца может быть очень сложным для анализа. Формально оно описывается следующим выражением:

$$\langle I(\mathbf{S}) \rangle = \langle |F_m(\mathbf{S})F_L(\mathbf{S})|^2 \rangle \quad (14.2)$$

где угловые скобки означают, что интенсивность для упорядоченного набора молекул

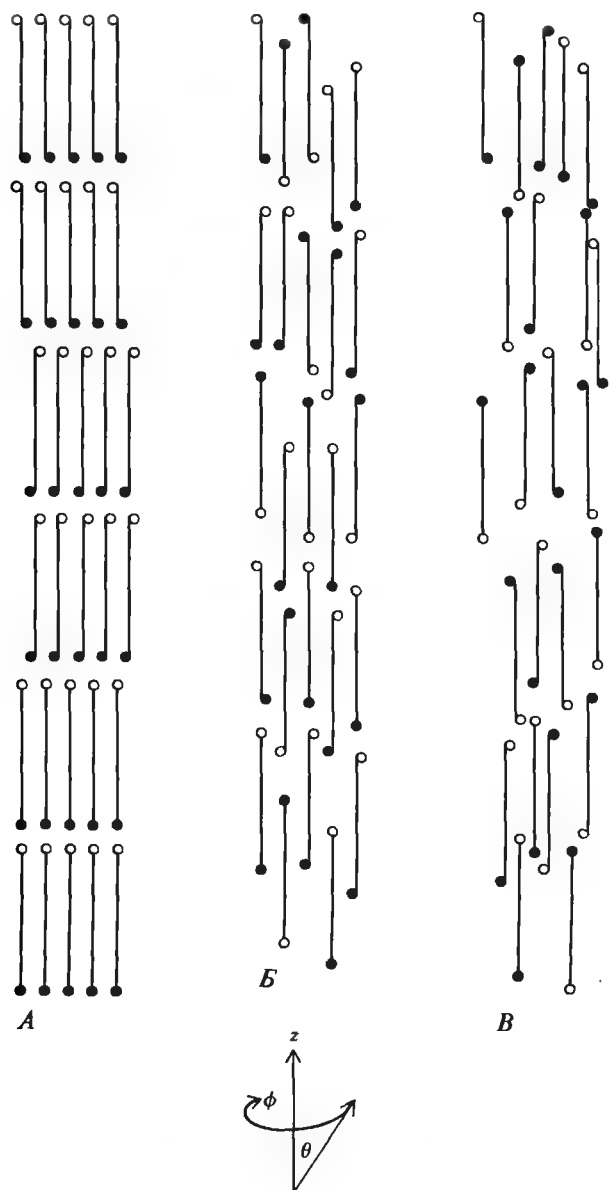


РИС. 14.1. Схематическая иллюстрация некоторых типов волокон, образованных из стержнеобразных молекул. *А.* Кристаллическое волокно. Угол ориентации θ один и тот же у всех молекул. Волокно состоит из монокристаллов, внутри которых расположение молекул упорядочено как вдоль z , так и по углу ϕ (азимутальный угол); однако азимутальная ориентация микрокристалла как целого случайна (в общем случае случайно и расположение его вдоль z). *Б.* Полукристаллическое волокно. Ориентация по θ одинакова у всех молекул, но микрокристаллы отсутствуют. В направлениях, перпендикулярных z , все еще существует довольно регулярная решетка, но расположение молекул неупорядочено как вдоль z , так и по углу ϕ . *В.* Некристаллическое волокно. У такого волокна упорядоченность состоит лишь в том, что угол θ одинаков для всех молекул; регулярная решетка отсутствует.

должна быть усреднена по различным типам беспорядка в волокне, а именно по решеточным и молекулярным ориентациям.

При низком разрешении случайная ориентация молекул не проявляется. Образец напоминает упорядоченную решетку из стержней. В результате усреднение, обозначенное в уравнении (14.2), не затронет решеточное «вырезание» интенсивности при малых $|S|$. Однако при высоком разрешении случайная ориентация молекул даст существенный эффект. При больших $|S|$ решеточное вырезание исчезнет, и все, что останется, — это молекулярный структурный фактор, усредненный по вращению.

В некристаллическом волокне сохраняется единственный элемент упорядоченности, а именно: продольные оси молекул имеют общее направление. Поворотная ориентация вокруг этого направления случайна, и, кроме того, нет регулярности в упаковке молекул (рис. 14.1, В). Расстояния, разделяющие молекулы, не строго одинаковы, так что решетка, по существу, отсутствует. Наблюдаемая интенсивность рентгеновского рассеяния определяется просто молекулярным структурным фактором, усредненным по вращению:

$$\langle I(S) \rangle \doteq \langle |F_m(S)|^2 \rangle \quad (14.3)$$

РАСЧЕТ РАССЕЯНИЯ ОТ СПИРАЛИ

Экспериментальные данные, представленные в уравнении (14.3), недостаточны для расчета структуры, однако их можно использовать для того, чтобы выбрать лучшую из моделей структуры. Так, в случае спиральных молекул некоторые общие характеристики их структуры могут быть прямо получены из анализа данных рентгеновского рассеяния. На этом вопросе мы и остановимся ниже.

Основные параметры большинства типов вторичных структур белков и нуклеиновых кислот были впервые установлены благодаря изучению волокон. Кроме того, та же самая теория может быть использована для анализа структур, образованных спирально расположенными белковыми субъединицами (такие структуры обнаружены в микротрубочках, актине, бактериофагах, вирусах), или целых слоев из субъединиц (подобные структуры найдены в мышцах, головках бактериофагов, в мембранах).

Рассмотрим молекулу, представляющую собой одиночную спираль и составленную из одинаковых атомов, бесконечно повторенных с помощью операции винтовой симметрии. Такая молекула — это по существу миниатюрный кристалл. Решеткой здесь является последовательность точек, расположенных на спирали. Структурный фактор для этой молекулы будет даваться аналогом уравнения (13.60):

$$F_{\text{сумм}}(S) = f(S)F_\ell(S) \quad (14.4)$$

Здесь $f(S)$ — атомный рассеивающий фактор, $F_\ell(S)$ — вырезающая фнкция, порожденная спиральной решеткой, т.е. $F_\ell(S)$ — фурье-преобразование спиральной решетки. Для расчета структурного фактора молекулы удобно воспользоваться теоремой свертки, представленной уравнением (13.52).

Спиральную решетку можно описать математически, образовав произведения (пересечения) спиральной линии с набором плоскостей, каждая из которых соответствует положению отдельного остатка (рис. 14.2). Фурье-преобразование произведения равняется свертке фурье-преобразований двух сомножителей [уравнение (13.52)]. Следовательно, вырезающая функция точечной спиральной решетки дается просто выражением

$$F_\ell = \widehat{F_c F_u} \quad (14.5)$$

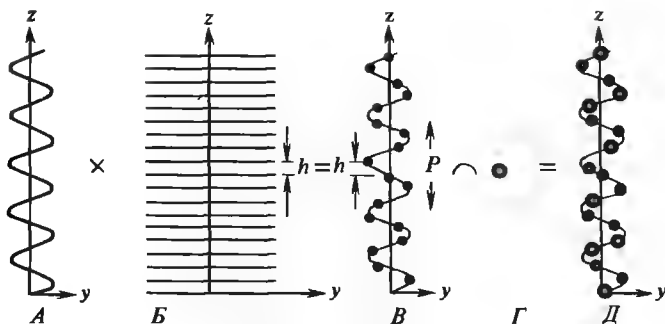


РИС. 14.2. Последовательные шаги в описании спирального полимера. *А.* Спиральная линия. *Б.* Ряд параллельных плоскостей, перпендикулярных оси спирали z . *В.* Спиральная точечная решетка (пересечение, или произведение, элементов *А* и *Б*). *Г.* Один остаток (атом или молекула). *Д.* Спиральный полимер (свертка структур *В* и *Г*).

где F_c — фурье-преобразование непрерывной спиральной линии, а F_u — фурье-преобразование набора плоскостей. [Заметим, что, согласно уравнению (13.7), F_c и F_u являются также структурными факторами для непрерывной спирали и ряда плоскостей соответственно, а F_ℓ — структурный фактор для ряда точек на спирали.] Простейший подход к описанию вырезающей функции ориентированной спиральной решетки состоит в том, чтобы вывести общее выражение для F_c и затем произвести свертку его с F_u .

Отметим, что в этой простой модели каждый из располагающихся по спирали остатков считается точкой. Все остатки расположены на расстоянии r от оси спирали, где r — радиус спирали. Чтобы рассчитать рентгеновское рассеяние от более реалистической спиральной структуры, следует в каждую из упомянутых точек поместить остаток, состоящий из набора атомов. Структура такой молекулярной спирали может быть описана как свертка точечной решетки со структурой одного остатка¹⁾. Таким образом, если F_R — структурный фактор одного остатка, то общим структурным фактором спирали будет [по теореме свертки в уравнении (13.54)] произведение

$$F_{\text{сумм}} = F_R F_\ell \quad (14.6)$$

СТРУКТУРНЫЙ ФАКТОР НЕПРЕРЫВНОЙ СПИРАЛИ В ЦИЛИНДРИЧЕСКИХ КООРДИНАТАХ

Рассеяние от непрерывной спирали легче всего рассчитать, используя цилиндрическую систему координат, показанную на рис. 14.3. Пусть ось спирали параллельна оси z в прямом (реальном) пространстве, а в обратном пространстве выберем декартову систему координат, у которой оси X , Y , Z параллельны осям x , y , z прямого пространства. Тогда в цилиндрических координатах в обратном пространстве появится переменная R , которая соответствует переменной r прямого пространства, представляющей радиус. Подобно этому угол ψ в обратном пространстве соответствует углу ϕ в прямом пространстве.

Структурный фактор в декартовых координатах был дан в уравнении (13.7):

¹⁾ Описание будет более сложным, если вдоль спирали меняются тип или ориентация отдельных остатков.

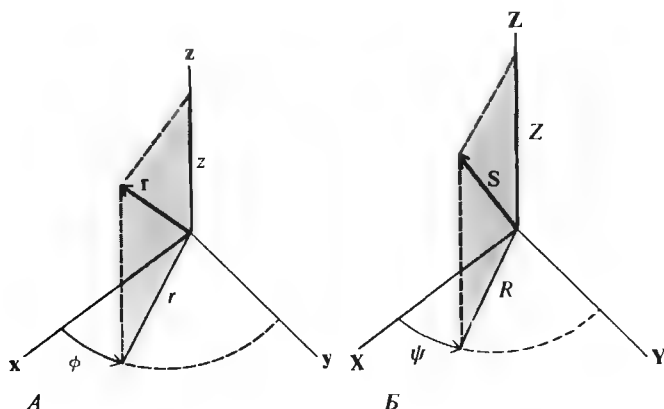


РИС. 14.3. Цилиндрическая система координат для описания дифракции от спиралей. А. Прямое (реальное) пространство. Б. Обратное пространство.

$$F(S) = \int_{-\infty}^{\infty} dr \rho(r) e^{2\pi i S \cdot r} \quad (14.7)$$

Представим величину $S \cdot r$ в виде суммы компонент по осям x , y и z :

$$\begin{aligned} S \cdot r &= (\hat{x}S_x + \hat{y}S_y + \hat{z}S_z) \cdot r = [\hat{x}(\hat{X} \cdot S) + \hat{y}(\hat{Y} \cdot S) + \hat{z}(\hat{Z} \cdot S)] \cdot r = \\ &= (\hat{x} \cdot r)(\hat{X} \cdot S) + (\hat{y} \cdot r)(\hat{Y} \cdot S) + (\hat{z} \cdot r)(\hat{Z} \cdot S) \end{aligned} \quad (14.8)$$

где $\hat{x}$, $\hat{y}$, $\hat{z}$ и $\hat{X}$, $\hat{Y}$, $\hat{Z}$ — единичные векторы в прямом и обратном пространствах соответственно. Далее, уравнение (14.7) преобразуется к цилиндрическим координатам, если учесть, что $\hat{z} \cdot r = z$, $\hat{Z} \cdot S = Z$, $\hat{x} \cdot r = r \cos \phi$, $\hat{X} \cdot S = R \cos \psi$, $\hat{y} \cdot r = r \sin \phi$, $\hat{Y} \cdot S = R \sin \psi$ и $dr = r d\phi dr dz$. При использовании этих соотношений уравнение (14.7) приводится к виду

$$F_c(R, \psi, Z) = \int_0^{\infty} r dr \int_0^{2\pi} d\phi \int_{-\infty}^{\infty} dz \rho(r, \phi, z) e^{2\pi i [rR(\cos \phi \cos \psi + \sin \phi \sin \psi) + zZ]} \quad (14.9)$$

Уравнение (14.9) можно упростить в несколько приемов. Заметим, что тригонометрические члены в экспоненте могут быть записаны как $\cos(\phi - \psi)$. Для спиральной линии $\rho(r, \phi, z)$ равняется нулю при всех r , кроме $r = r_h$, где r_h — радиус спирали. Кроме того, это константа, не зависящая от ϕ и z , т.е. $\rho(r, \phi, z) = C\delta(r - r_h)$. Таким образом, интегрирование по r просто дает константу, пропорциональную электронной плотности спиральной линии. Эту константу можно опустить, поскольку она влияет лишь на величину F_c . С учетом этих упрощений уравнение (14.9) превращается в

$$F_c(R, \psi, Z) = \int_0^{2\pi} d\phi \int_{-\infty}^{\infty} dz e^{2\pi i [r_h R \cos(\phi - \psi) + zZ]} \quad (14.10)$$

ДИСКРЕТНЫЙ ХАРАКТЕР СТРУКТУРНОГО ФАКТОРА СПИРАЛИ

Спираль периодична вдоль z . При перемещении по оси z на расстояние P структура ее в точности повторяется; P — это шаг спирали. Иначе говоря, для любых фиксированных

значений r_h и ϕ изменение электронной плотности вдоль z совершенно аналогично тому, что наблюдается в случае одномерного кристалла. Как показано в гл. 13, любое распределение электронной плотности, которое повторяется вдоль z с периодом P , может давать рентгеновское рассеяние только в наборе плоскостей, перпендикулярных z . Используя систему координат, представленную на рис. 14.3, мы можем разместить эти плоскости в обратном пространстве в точках $Z = n/P$, где n — целое число. Таким образом, интеграл по z в уравнении (14.10) обратится в нуль везде, кроме этих плоскостей.

Точка спиральной линии смещается на P при каждом повороте на 2π по углу ϕ . Следовательно, координата z связана с шагом спирали простым соотношением $z = P\phi/2\pi$. Поэтому произведение zZ в уравнении (14.10) можно выразить через ϕ :

$$zZ = (P\phi/2\pi)(n/P) = n\phi/2\pi \quad (14.11)$$

Единственное интегрирование, остающееся теперь в уравнении (14.10), — это интегрирование по ϕ :

$$F_c(R, \psi, n/P) = \int_0^{2\pi} e^{2\pi i r_h R \cos(\phi - \psi) + i n \phi} d\phi \quad (14.12)$$

С первого взгляда может показаться, что такое интегрирование — задача неразрешимая, но, оказывается, интеграл (14.12) можно связать с функцией Бесселя. Это не столь уж удивительно: функции Бесселя часто встречаются при решении задач в цилиндрических координатах. Можно воспользоваться следующим равенством:

$$J_n(x) = (1/2\pi i^n) \int_0^{2\pi} e^{ix \cos y + iny} dy \quad (14.13)$$

где J_n — функция Бесселя первого рода. Когда мы введем в (14.12) замену $y = \phi - \psi$ и $x = 2\pi r_h R$ (не обращая внимания на постоянные множители 2π , которые меняют только модуль величины F_c , и учитывая, что $i^n = e^{in\pi/2}$), то в результате получим, что структурный фактор спирали есть

$$F_c(R, \psi, n/P) = J_n(2\pi r_h R) e^{in(\psi + \pi/2)} \quad (14.14)$$

Таким образом, у непрерывной спирали с радиусом r_h и шагом P структурным фактором является набор функций Бесселя, каждая из которых определена на слоевой плоскости $Z = n/P$ обратного пространства. Заметим, что амплитуда рассеяния J_n радиально-симметрична. Она не зависит ни от ϕ , ни от ψ ; от угла зависит только фаза.

КРЕСТООБРАЗНАЯ КАРТИНА РАССЕЯНИЯ ОТ СПИРАЛЬНОЙ ЛИНИИ

Если бы нашим объектом служила одиночная непрерывная спираль, измеряемая интенсивность рассеяния, согласно уравнению (14.14), равнялась бы

$$I_c(R, n/P) = F_c^* F_c = J_n^2(2\pi r_h R) \quad (14.15)$$

На рис. 14.4 представлен вид этой функции при различных n от 0 до 7. Можно показать, что $J_{-n}^2 = J_n^2$, а $J_n^2(-R) = J_n^2(R)$.

Рентгеновские данные для волокон обычно получают, когда волокно ориентировано так, что ось Z вертикальна, а ось R горизонтальна. В этом случае наблюдается ряд равноотстоящих горизонтальных слоевых плоскостей (в сечении — линий). Расстояние между ними в обратном пространстве равно $1/P$, что позволяет определить P .

На каждой слоевой линии наблюдается ряд максимумов интенсивности. Величина каждого из этих максимумов падает с ростом R . Кроме того, положение первого и наиболее интенсивного максимума последовательно сдвигается к большим значениям R с ростом n .

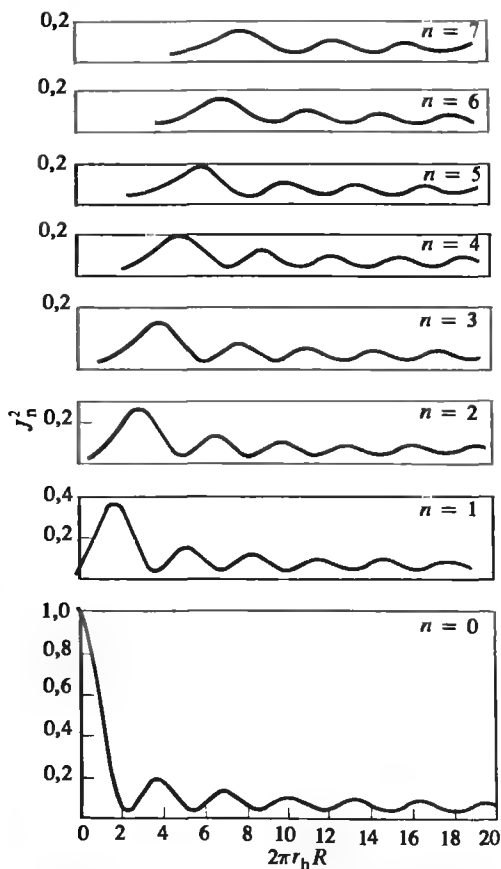


РИС. 14.4. Бесселевы функции, из которых может складываться картина рентгеновского рассеяния от спиралей. Показаны $J_n^2(2\pi r_h R)$ для n от 0 до 7. Обратите внимание на последовательный сдвиг первого максимума и уменьшение его интенсивности по мере роста n . (Fraser R.D.B., MacRae T.P. Conformation in Fibrous Proteins and Related Synthetic Polypeptides, New York, Academic Press, 1973.)

Таким образом, характерной геометрической особенностью картины дифракции является то, что она напоминает косой крест: $\times$ (рис. 14.5, А). По мере того как n становится очень большим, ветви креста приближаются к прямым линиям, которые образуют угол δ с осью Z . Угол δ определяется предельным соотношением: $\delta = \lim_{n \rightarrow \infty} \arctg(P/2\pi r_h)$. Таким образом, из геометрии дифракционной картины от спирали можно сразу получить ее шаг и радиус.

СТРУКТУРНЫЙ ФАКТОР ТОЧЕЧНОЙ СПИРАЛИ

Результаты, рассмотренные до сих пор, относятся к спирали с непрерывной электронной плотностью. Для того чтобы рассмотреть спираль из отдельных остатков, расположенных на расстоянии h друг от друга в направлении z , можно воспользоваться уравнением (14.5).

Прежде всего нужно вычислить структурный фактор F_u для ряда параллельных плоскостей, перпендикулярных z и разделенных расстоянием h . Это легко сделать, если вспомнить, что фурье-преобразованием ряда равноотстоящих точек с характерным вектором a между ними является ряд плоскостей, перпендикулярных a и отстоящих друг от друга на $1/a$. Из взаимности прямого и обратного фурье-преобразований сразу следует, что струк-

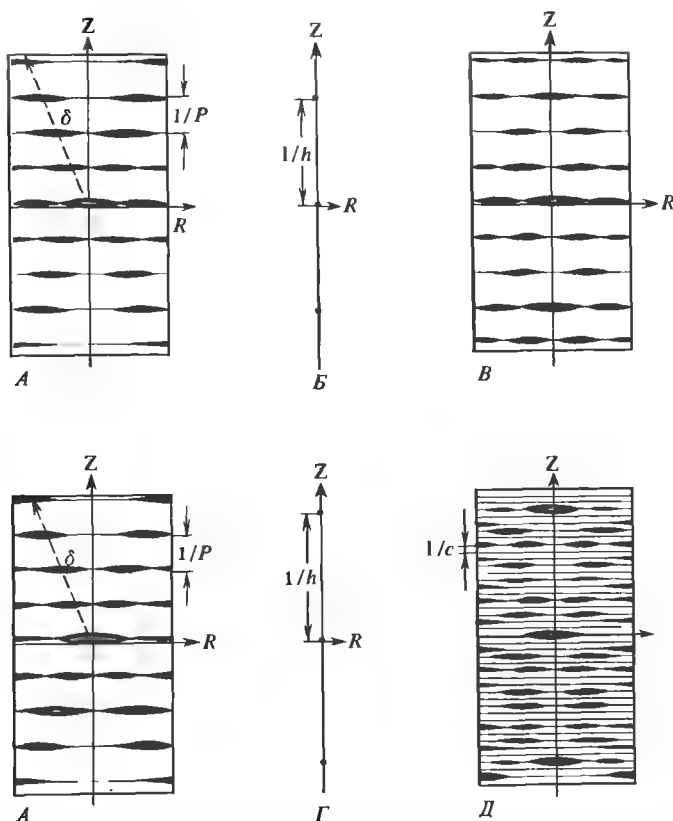


РИС. 14.5. Рентгеновское рассеяние от спирали, параллельной оси z в прямом пространстве, но равномерно прокрученной по углу ϕ . *А.* Картина распределения интенсивности от непрерывной спирали с шагом P . Угол δ — функция величины P/r_h (см. текст). *Б.* Фурье-преобразование ряда параллельных плоскостей, ориентированных так, как показано на рис. 14.2, и разделенных расстоянием $h = P/3$. *В.* Интенсивность рассеяния от точечной спиральной решетки (такой, как показано на рис. 14.2, *В*) с тремя точками на виток. Данная картина получена в результате свертки картин *А* и *Б*. *Г.* Фурье-преобразование ряда параллельных плоскостей, разделенных расстоянием $h = (5/18)P$, так что 18 точек решетки (остатков) приходится на 5 витков. *Д.* Картина дифракции от точечной спирали, у которой на виток приходится 3,6 остатка. Такая картина получается в результате свертки картин *А* и *Г*. Это результат, предсказываемый для рассеяния от α -спирали. В действительности беспорядок на малых расстояниях будет приводить к размытию дифракционной картины при больших Z и R . Четкие дифракционные пятна наблюдаются только в центральных областях картин *В* и *Д*. (Fraser R.D.B., MacRae T.P., Conformation in Fibrous Proteins and Related Synthetic Polypeptides, New York, Academic Press, 1973.)

турным фактором ряда плоскостей, разделенных одинаковым расстоянием h , будет ряд точек на оси Z , располагающихся в $0, \pm 1/h, \pm 2/h$ и т.д. (рис. 14.5, *Б, Г*). Таким образом, ненулевая амплитуда рассеяния может существовать только в точках $Z = m/h$, где m — любое целое число:

$$F_u(Z) = \sum_{m=-\infty}^{\infty} \delta(Z - m/h) \quad (14.16)$$

Полная дифракционная картина от точечной спирали будет сверткой двух дифракционных картин: $F_c(R, \psi, Z = n/P)$, даваемой уравнением (14.14), и F_u [уравнение (14.16)]. Это означает, что изображение $F_c(R, \psi, n/P)$ должно быть построено при каждом значении $Z = m/h$. Результат иллюстрируется (фактически для соответствующего усредненного по вращению F_c) на рис. 14.5, Б, Д.

Математически свертку $\widehat{F_c F_u}$ можно выразить как

$$F_c(R, \psi, Z) = \widehat{F_c F_u} = \sum_{n=-\infty}^{\infty} J_n(2\pi r_h R) e^{in(\psi + \pi/2)} \quad (14.17)$$

Для каждого значения Z суммирование проводится только по таким n , которые удовлетворяют ограничениям для Z , обсуждаемым выше. Таким образом, слоевые линии будут наблюдаться при всех Z , таких, что

$$Z = m/h + n/P \quad (14.18)$$

Следовательно, при каждом фиксированном значении m/h в свертке $\widehat{F_c F_u}$ возможны все целые значения n .

СТРУКТУРНЫЙ ФАКТОР СПИРАЛИ С ЦЕЛЫМ ЧИСЛОМ ОСТАТКОВ НА ВИТОК

Пусть спираль содержит целое число k остатков в расчете на виток: $k = P/h$. В этом случае картина рентгеновского рассеяния будет относительно простой. Рис. 14.5, Б, В иллюстрирует расчет структурного фактора для спирали с тремя остатками на виток (фактически показаны интенсивности, усредненные по вращению). Свертка $\widehat{F_c F_u}$ состоит попросту в том, что изображение F_c строится в начале координат, затем смещается на три слоевые линии и накладывается на предыдущее и т.д. В результате картина рассеяния будет повторяться каждую третью слоевую линию. В случае целочисленной спирали расстояние между слоевыми линиями определяет шаг спирали, а период повторяемости картины рассеяния прямо связан с количеством остатков на виток.

Чтобы продемонстрировать эти результаты математически, заменим $1/h$ в уравнении (14.18) на k/P :

$$Z = (1/P)(mk + n) = l/P \quad (14.19)$$

Поскольку m , k и n — целые, l также должно быть целым.

Чтобы рассчитать значение структурного фактора на данной слоевой линии, мы должны сложить в уравнении (14.17) все члены, которые удовлетворяют соотношению $l = mk + n$. Пусть $k = 3$ (три остатка на виток спирали). Тогда $F(R, \psi, Z = 0)$ будет содержать вклады от всех J_n , чей индекс n удовлетворяет уравнению $l = 3m + n = 0$, где m и n — целые. Очевидно, что $n = -3m$, и, следовательно, на нулевой слоевой линии структурный фактор есть

$$F(R, \psi, 0) = \sum_{m=-\infty}^{\infty} J_{3m}(2\pi r_h R) e^{i3m(\psi + \pi/2)} \quad (14.20)$$

Легко показать, что то же самое справедливо для любого $F(R, \psi, l)$, где l — целое кратное трем. Если мы положим $l = 3$, то $n = 3(1 - m)$, а это означает, что n по-прежнему может принимать значения $0, \pm 3, \pm 6$ и т.д. Следовательно, структурный фактор в картине дифракции повторяется каждую третью слоевую линию. Читателю следует попытаться получить подобные уравнения для $F(R, \psi, l = 1, 4, 7, \dots)$ и $F(R, \psi, l = 2, 5, 8, \dots)$.

СТРУКТУРНЫЙ ФАКТОР СПИРАЛИ С НЕЦЕЛЫМ ЧИСЛОМ ОСТАТКОВ НА ВИТОК

Многие спирали не имеют целого числа остатков на виток. Однако в большинстве таких случаев структуру можно описать как спираль, у которой k остатков приходится на V витков. Тогда истинный период спирали равен $d = VP$. Расстояние вдоль оси спирали между соседними остатками есть $h = VP/k$. Рис. 14.5, Г, Д иллюстрирует расчет картины дифракции от такой спирали. В данном примере $k = 18$, а $V = 5$. Свертка $\tilde{F}_c \tilde{F}_v$ размещает изображения F_c через каждые $1/h = (18/5)(1/P)$. Это приводит к гораздо более сложной картине дифракции, чем в случае целочисленной спирали.

Заметим, что у нецелочисленной спирали слоевые линии располагаются намного ближе друг к другу, чем у целочисленной, имеющей такой же шаг. Они появляются теперь не через каждые $1/P$, а через каждые $1/VP$. Картина дифракции повторяется каждую k -ю слоевую линию. Чтобы продемонстрировать эти результаты математически, подставим в уравнение (14.18) условие $h = VP/k$. Тогда мы получим, что слоевые линии должны проходить через точки

$$Z = l/VP, \text{ где } l \text{ дается суммой } mk + Vn \quad (14.21)$$

Заметим, что, когда $V = 1$, этот результат превращается в уравнение (14.19).

Поскольку m , k , V и n — все целые, l также должно быть целым. Читатель методом проб и ошибок может убедиться, что для любого выбранного нецелочисленного k/V существуют такие m и n , при которых l может принимать любые целые значения $0, \pm 1, \pm 2, \dots$. Таким образом, слоевые линии должны располагаться через каждые $1/VP$.

Чтобы вычислить члены в уравнении (14.17), которые дают вклад в структурный фактор на l -й слоевой линии, можно переписать определение l , данное в уравнении (14.21):

$$n = (l - mk)/V \quad (14.22)$$

Нужно рассматривать только такие l и m , которые приводят к целым значениям n . Например, пусть $k = 18$, $V = 5$, а $l = 3$. Тогда уравнение (14.22) дает

$$n = (3 - 18m)/5 \quad (14.23)$$

Возможные целые значения n находятся в результате перебора всех возможных целых значений m . [Лучше всего построить график по уравнению (14.23).] В итоге имеем

m	-9	-4	+1	+6	$\dots$
n	+33	+15	-3	-21	$\dots$

Таким образом, J_{-3}, J_{+15}, J_{-21} и J_{+33} дают вклад в структурный фактор на третьей слоевой линии.

Повторяющийся характер структурного фактора можно увидеть, если записать $l = kj$, где j — целое. Тогда уравнению (14.22) удовлетворяют значения $n = k(j - m)/V$, где $j - m$ должно быть подобрано так, чтобы n было целым. Допустимые значения $(j - m)$ одни и те же, каким бы ни было j . Таким образом, дифракционная картина должна повторяться каждую k -ю слоевую линию.

ИНТЕНСИВНОСТЬ РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ ОТ СПИРАЛИ, УСРЕДНЕННОЙ ПО ВРАЩЕНИЮ

До сих пор мы имели дело со структурными факторами, тогда как измерять можно только интенсивности рассеяния. Для одиночной спирали, имеющей ориентацию ϕ в пря-

мом пространстве,

$$I(R, \psi, Z = l/VP) = F_\ell^* F_\ell = \sum_n J_n(2\pi r_h R) e^{in(\psi + \pi/2)} \sum_{n'} J_{n'}(2\pi r_h R) e^{-in'(\psi + \pi/2)} \quad (14.24)$$

где каждое суммирование проводится для данной слоевой линии l по таким значениям n и n' , которые допускаются уравнением (14.22). Если два этих суммирования объединить, то

$$I(R, \psi, Z = l/VP) = \sum_n \sum_{n'} J_n(2\pi r_h R) J_{n'}(2\pi r_h R) e^{i(n-n')\pi/2} e^{i(n-n')\psi} \quad (14.25)$$

Практически в некристаллическом или полукристаллическом волокне с равной вероятностью встречаются все ориентации по углу ϕ . Следовательно, чтобы рассчитать наблюдаемую картину дифракции, мы должны усреднить уравнение (14.25) по соответствующему углу в обратном пространстве, т.е. по ψ . Интегрируя по ψ , находим

$$\langle I(R, Z = l/VP) \rangle = \sum_n \sum_{n'} J_n(2\pi r_h R) J_{n'}(2\pi r_h R) e^{i(n-n')\pi/2} \int_0^{2\pi} d\psi e^{i(n-n')\psi} \quad (14.26)$$

Но интеграл по ψ отличен от нуля только при $n = n'$. Таким образом,

$$\langle I(R, Z = l/VP) \rangle = \sum_n J_n^2(2\pi r_h R) \quad (14.27)$$

Это уравнение с учетом ограничений, определяемых для n в уравнении (14.22), использует непосредственно для расчета картины дифракции. В действительности именно результаты, предсказываемые этим уравнением, были изображены графически на рис. 14.5, В, Д.

МОДЕЛЬ ДЛЯ α -СПИРАЛИ

Покажем, как уравнение (14.27) может быть использовано при анализе рентгеновской дифракции от ориентированного волокна, состоящего из α -спиралей. У α -спирали на 5 витков приходится 18 остатков. Слоевые линии будут появляться при $Z = l/5P$, где $l = 18m + 5n$. Интенсивности рефлексов на слоевых линиях будут пропорциональны J_n^2 для всех целых n , удовлетворяющих этому условию для l . Практически при каждом l значительный вклад в интенсивность дает лишь одно значение n .

На рис. 14.6 представлена фотография дифракционной картины от α -спирального волокна.

В табл. 14.1 сравниваются экспериментально наблюдаемые и предсказанные для каждой слоевой линии интенсивности. Качественное согласие превосходное. Дифракция относительно наиболее сильна на тех слоевых линиях, которые содержат вклады от J_0^2 , $J_{\pm 1}^2$ или $J_{\pm 2}^2$. Это именно то, чего следует ожидать ввиду уменьшения величины J_n^2 с ростом n (рис. 14.4). Например, J_0^2 появляется только на каждой 18-й слоевой линии, ибо, когда $n = 0$, $l = 18m$. $J_{\pm 1}^2$ появляется при $l = 18m \pm 5$. Вклад от него наблюдается при $l = \pm 5$ ($m = 0$) и при $l = \pm 13$ ($m = \pm 1$).

На рис. 14.7, А показана геометрия типичного эксперимента по рентгеновской дифракции в волокнах. Для ясности фотографическая пленка, имеющая обычно цилиндрическую форму, развернута в плоский лист. Волокно параллельно оси цилиндра. Вертикальная ось на пленке (соответствующая оси Z обратного пространства) называется меридианом, а горизонтальная (соответствующая оси R обратного пространства) — экватором. Интенсивность рассеяния будет наблюдаться везде, где сфера отражения пересекается с обратной решеткой F_ℓ волокна.

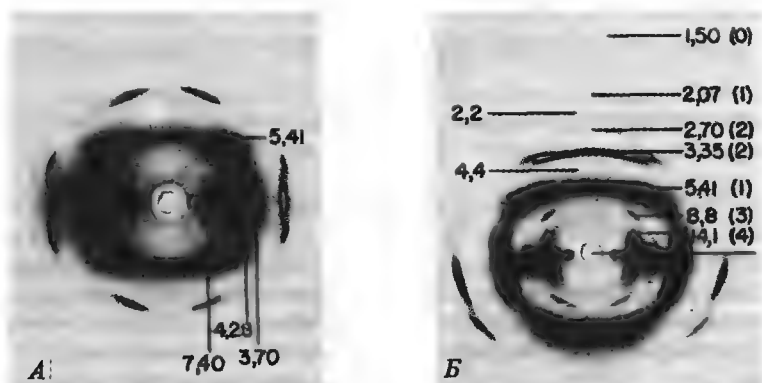


РИС. 14.6. Экспериментальная картина рентгеновского рассеяния от волокон α -спирального поли-L-аланина. А. Картина дифракции от волокна, расположенного перпендикулярно направлению падающего пучка рентгеновских лучей. Б. Волокно отклонено от направления падающего пучка на 31° . Числа — соответствующие расстояния в $\text{\AA}^{-1}$; числа в скобках указывают порядок функций Бесселя, дающих вклад в отдельные слоевые линии. (Любезно предоставлено Л. Брауном.)

На опыте обычно невозможно измерять рассеяние на меридиане в месте его пересечения с экватором (при $l = 0$), так как данное место находится прямо в рентгеновском пучке, и любое рассеяние теряется на фоне интенсивности этого пучка. Из вида функций Бесселя (рис. 14.4) следует, что только J_0 имеет конечную интенсивность на оси Z (меридиане-

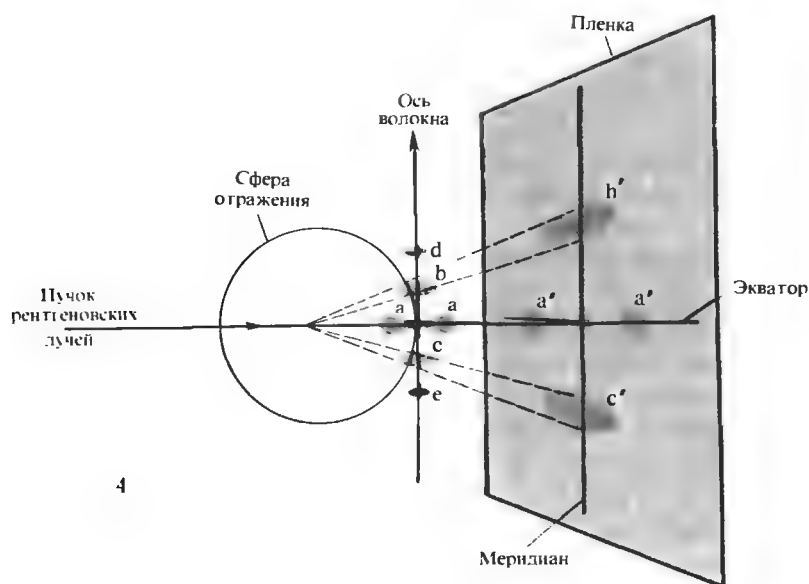
Таблица 14.1

ИНТЕНСИВНОСТИ, НАБЛЮДАЕМЫЕ НА СЛОЕВЫХ ЛИНИЯХ В СЛУЧАЕ ПОЛИ- γ -МЕТИЛ-L-ГЛУТАМАТА, И ФУНКЦИИ БЕССЕЛЯ, КОТОРЫЕ, СОГЛАСНО РАСЧЕТАМ, ДОЛЖНЫ ДАВАТЬ ВКЛАД В ДИФРАКЦИЮ ОТ α -СПИРАЛИ¹⁾, 2)

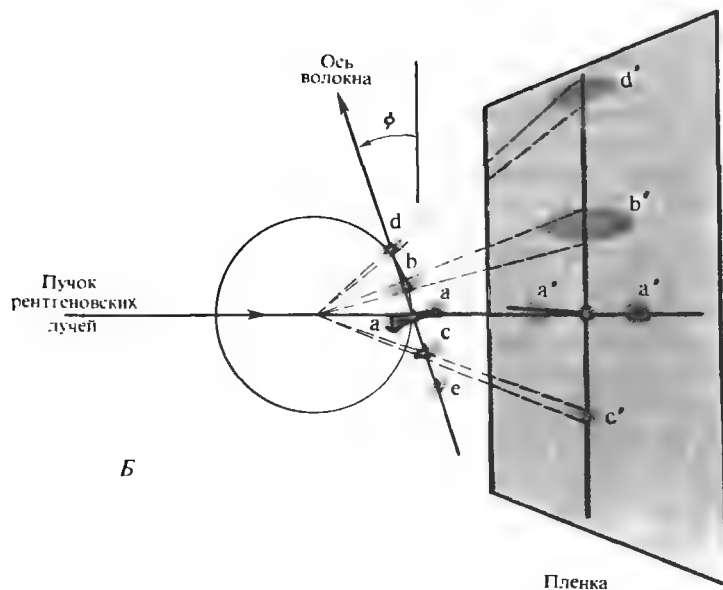
Слоевая линия, l	$I_{\text{набл}}$	n	Слоевая линия, l	$I_{\text{набл}}$	n	Слоевая линия, l	$I_{\text{набл}}$	n
0	vvs	0	10	w	2	20	—	4
1	—	7	11	—	5	21	—	3
2	vw	4	12	—	6	22	—	8
3	vvw	3	13	vvw	1	23	vvw	1
4	—	8	14	—	8	24	—	6
5	m	1	15	—	3	25	—	5
6	—	6	16	—	4	26	vvw	2
7	—	5	17	—	7	27	—	9
8	vvw	2	18	vw	0	28	vvw	2
9	-	9	19	—	7			

¹⁾ Walton A. G., Blackwell J., Biopolymers, New York, Academic Press, 1973.

²⁾ Наблюдаемые интенсивности обозначены следующим образом: vvs — крайне сильная; m — умеренная; w — слабая; vw — очень слабая; vvw — крайне слабая.



4



Б

РИС. 14.7. Схематические иллюстрации к измерению рентгеновской дифракции от волокон. Вдоль оси волокна показана обратная решетка спирали. Дифракционное пятно появляется только там, где эта решетка пересекается со сферой отражения. *А.* Ось волокна перпендикулярна падающему пучку. *Б.* Ось волокна наклонена таким образом, чтобы можно было зафиксировать меридиональное пятно в положении d' . (Dickerson R.E. In: The Proteins, 2d ed., vol. 2, ed. H. Neurath, New York, Academic Press.).

не). Следовательно, первый ожидаемый меридиональный рефлекс должен появляться при $l = 18$. После слоевой линии с $l = 0$ первые по-настоящему сильные внемеридиональные рефлексы возникнут при $l = \pm 5$.

Таким образом, исследуя именно эти две особенности картины дифракции, можно определить число остатков, приходящееся на виток спирали. Далее, зная координату Z для одной из слоевых линий, можно подсчитать шаг витка как $P = l/5Z$. Однако здесь могут встретиться серьезные затруднения. Интенсивность многих слоевых линий настолько слаба, а дифракционные пятна от волоконных образцов столь широки, что индиферирование видимых слоевых линий может оказаться весьма нелегкой задачей.

РЕНТГЕНОВСКОЕ РАССЕЯНИЕ ОТ РЕАЛЬНОЙ α -СПИРАЛИ

Количественное согласие между наблюдаемыми и предсказываемыми интенсивностями дифракции от α -спирали, которые представлены в табл. 14.1, не столь уж блестящее. Это становится более очевидным при детальном анализе типичной дифракционной картины от α -спирального образца (рис. 14.6, А), если сравнить ее с теоретически предсказываемой картиной (рис. 14.5, Д). По мере продвижения от центра дифракционного изображения в вертикальном направлении наблюдаемая картина становится более слабой. Далее, 13-я слоевая линия намного слабее, чем 5-я, хотя, согласно предсказаниям простой теории, они должны быть одинаковыми. Меридионального пятна на 18-й слоевой линии вовсе не видно, если не наклонить волокно, но и в этом случае оно оказывается очень слабым. Кроме того, на слоевых линиях наблюдаются дополнительные дифракционные пятна в таких положениях, которые не соответствуют максимумам функций J_n^2 .

Все это можно объяснить, если учесть отличия реального α -спирального образца от той точечной спирали, которую мы использовали для моделирования его структуры. Каждый остаток реальной спирали представляет собой группу атомов. Каждый из атомов этой группы лежит на спирали с одним и тем же шагом P , но радиусы для разных атомов различны. Картина рассеяния будет содержать вклады от отдельных атомных рассеивающих факторов и интерференционные вклады, обусловленные пространственным разделением атомов. Наконец, упаковка спиралей в волокне даст интерференционные пятна вдоль каждой слоевой линии, которые отражают характерное расстояние между спиральями.

Обратимся еще раз к экспериментальной дифракционной картине и посмотрим, к каким заключениям можно прийти, анализируя только ее самое. Не располагая никакими предварительными данными об α -спирали, в качестве первой слоевой линии ($l = 1$) мы должны были бы выбрать линию с сильной дифракцией при $Z = 1/5,41 \text{ \AA}^{-1}$. В предположении целого числа остатков на виток это дает шаг спирали $5,41 \text{ \AA}$. Если волокно параллельно оси Z , дифракционные пики на меридиане отсутствуют. Однако наклон волокна приводит к появлению меридионального рефлекса в точке $Z = 1/1,5 \text{ \AA}^{-1}$. Делим $5,41$ на $1,5$, что дает нам $3,6$ остатка на виток. Поскольку результат — не целое число, линия при $Z = 1/5,41 \text{ \AA}^{-1}$ не может быть первой слоевой. Однако учитывая, что $3,6 = 18/5$, мы вскоре приходим к правильному индиферированию.

Почему необходимо наклонять волокно для того, чтобы увидеть рефлекс $1/1,5 \text{ \AA}^{-1}$? Вся рассчитанная картина дифракции изображена в обратном пространстве. Но так же, как и в случае кристаллов, наблюдать можно только те точки обратной решетки, которые находятся на пересечении со сферой отражения. Как показано схематически на рис. 14.7, А даже когда волокно нормально к рентгеновскому пучку, область обратного пространства около $Z = 1/5,41 \text{ \AA}^{-1}$ расположена достаточно близко к сфере отражения, чтобы от нее можно было зафиксировать какую-то интенсивность. Однако область около $1/1,5 \text{ \AA}^{-1}$ расположена слишком далеко, и, чтобы она попала на сферу отражения, волокно должно быть наклонено.

ВЛИЯНИЕ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОЙ УПАКОВКИ НА КАРТИНУ ДИФРАКЦИИ ОТ α -СПИРАЛИ

В начале этого раздела говорилось о том, что в случае полукристаллического волокна наличие межмолекулярной упорядоченности может приводить к дискретности дифракционной картины при малых $|S|$, соответствующих низкому разрешению. Этот эффект проявляется на рентгенограмме α -спирали (рис. 14.6).

На нулевой слоевой линии (экваторе) наблюдается система отдельных пятен для расстояний, слишком больших (слишком маленьких обратных расстояний), чтобы эти пятна могли соответствовать последовательным максимумам функции J_0^2 . Следовательно, эти пятна должны быть связаны с упаковкой отдельных спиралей. Нулевая слоевая линия — это область, где наиболее вероятно проявление эффектов решеточного «вырезания», поскольку дифракция здесь определяется проекцией структуры на плоскость, перпендикулярную оси волокна. Благодаря этому исключены какие-либо нерегулярности, связанные с упаковкой вдоль оси спирали.

Для спиралей или других псевдоцилиндрических объектов наиболее обычна гексагональная упаковка. Из рис. 14.8 видно, что в случае плотно упакованных цилиндров радиуса a двумя основными межплоскостными расстояниями являются $a\sqrt{3}$ и a . Эти периоды вызовут появление дифракционных пятен на расстояниях $1/a\sqrt{3}$, $2/a\sqrt{3}$ и т.д. и на расстояниях $1/a$, $2/a$ и т.д. от оси Z в обратном пространстве. В картине дифракции от α -спирального образца, показанной на рис. 14.6, соответствующие расстояния для пятен на нулевой слоевой линии есть $1/7,40 \text{ \AA}^{-1}$, $1/4,28 \text{ \AA}^{-1}$ и $1/3,70 \text{ \AA}^{-1}$. Методом проб и ошибок находим, что отношение этих расстояний для первых двух пятен равно $(1/\sqrt{3}):1$, для первого и третьего — $(1/2):1$. Таким образом, если $a = 4,28 \text{ \AA}$, то данным пятнам отвечают расстояния $1/a\sqrt{3}$, $1/a$ и $2/a\sqrt{3}$ соответственно. Этот подсчет подтверждает, что происхождение пятен обусловлено гексагональной упаковкой, и позволяет приписать радиусу спирали значение a .

РЕНТГЕНОВСКОЕ РАССЕЯНИЕ ОТ ВОЛОКОН НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Те же принципы, что были использованы выше для анализа рентгеновского рассеяния от полипептидной спирали, применимы и к одноцепочечным нуклеиновым кислотам. На рис. 14.9, *A* представлен пример: рентгенограмма высококристаллического волокна

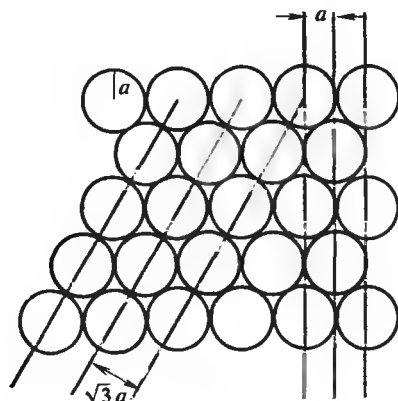


РИС. 14.8. Гексагональная решетка, образующаяся в результате плотной упаковки цилиндров радиуса a . Такая упаковка приводит, как показано, к периодичностям $a\sqrt{3}$ и a . Эти периодичности вызывают появление дополнительных дифракционных пятен на экваторе (см. рис. 14.6, *A* и текст).

poly (C). На 6-й слоевой линии — сильный меридиональный рефлекс. Следовательно, это должна быть спираль с шестью остатками на виток. Далее, расстояние между слоевыми линиями указывает на то, что последовательные остатки отстоят друг от друга вдоль оси спирали на $3,11 \text{ \AA}$ ¹⁾. Последующий анализ дает некоторые дополнительные детали структуры и показывает, что в этом волокне в элементарной ячейке содержатся три спирали poly (C). На рис. 22.5 представлена модель структуры, согласующаяся с наблюдаемыми рентгеновскими данными.

Наше рассмотрение можно распространить на многоцепочечные спирали и на сверхспирали (спирали из спиралей). Здесь мы этого не делаем, отсылая заинтересованного читателя к более специальным источникам. Общий вид картины дифракции остается качественно похожим. На рис. 14.9, Б показана как один из примеров дифракционная картина, полученная для двойной спирали В-формы ДНК. Она имеет классическую крестообразную форму, более близкую к предсказываемой для непрерывной спирали, чем в случае α -спиральной дифракции. Отношение расстояний в обратном пространстве от начала координат до первой слоевой линии и до сильного меридионального рефлекса (с периодом $3,4 \text{ \AA}$) равняется 1:10. Это означает, что у данной спирали на виток приходится 10 остатков.

На рис. 14.9, Б показана также рентгенограмма волокна, в котором двойная спираль ДНК находится в А-форме. Эта картина намного более сложна, чем в случае В-формы. Одной из особенностей, которая, однако, заметна сразу, является то, что слоевые линии у А-ДНК расположены дальше друг от друга, чем у В-ДНК. Поскольку расстояния на рентгенограмме соответствуют обратным расстояниям, это является свидетельством того, что у А-ДНК шаг спирали меньше, чем у В-ДНК.

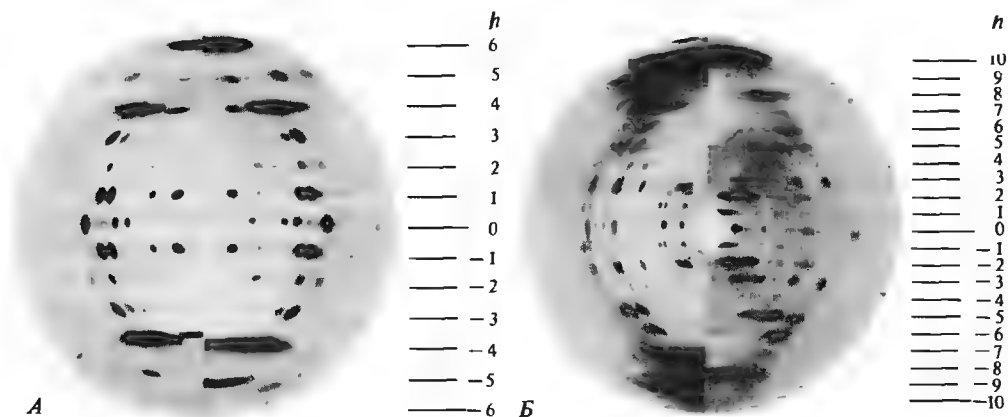


РИС. 14.9. Рентгеновская дифракция от волокон нуклеиновых кислот. Указаны индексы слоевых линий. А. Натриевая соль (слева) и рубидиевая соль (справа) одноцепочечной poly (C). [Arnott S., Chandrasekaran R., Leslie A.G.W., J. Mol. Biol., 106, 735 (1976).] Б. ДНК *Clostridium perfringens*. Представлены А-форма (слева) и В-форма (справа) двойной спирали. [Selsing E., Arnott S., Nucleic Acids Research, 3, 2443 (1976).]

¹⁾ Этот параметр можно определить сразу, зная положение рефлекса на меридиане. — Прим. перев.

14.2. Рентгеновское рассеяние в растворе

Если не удастся приготовить подходящий кристалл или волокно, то полезную информацию о структуре макромолекулы все же можно получить, измеряя рентгеновское рассеяние от разбавленного раствора. Картина взаимодействия рентгеновских лучей с объектом описывается с помощью той же геометрии ($\hat{s}_0$ и $\hat{s}$), что использовалась в гл. 13, однако теперь исследуемые молекулы составляют лишь малую долю объекта. Поэтому фактически необходимо измерять лишь долю рассеяния от системы макромолекула — растворитель, которая является добавочной к рассеянию от чистого растворителя. Это приводит к осложнениям, на которых мы остановимся позже, когда будут обсуждаться проблемы контраста при рассеянии нейтронов.

РАСЧЕТ РАССЕЯНИЯ ОТ РАСТВОРА ПУТЕМ УСРЕДНЕНИЯ ПО ВСЕМ ВОЗМОЖНЫМ ОРИЕНТАЦИЯМ МОЛЕКУЛ

Будем считать, что мы можем работать со столь сильно разбавленными растворами, когда влияние межмолекулярной интерференции становится пренебрежимо малым. Тогда мгновенная картина рассеяния для одной молекулы (если бы мы могли ее наблюдать) есть не что иное, как молекулярный структурный фактор, даваемый уравнением (13.27):

$$F_m(S) = \sum_{n=1}^N e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}_n} f_n(S) \quad (14.28)$$

где суммирование проводится по всем N атомам в молекуле. В данном случае мы не можем получить детальную информацию об атомной структуре объекта, так что удобнее выразить структурный фактор по-другому — как сумму по всем электронам в молекуле. Тогда $f_n(S)$ можно заменить рассеивающим фактором для одного *электрона*, $f_0(S)$, и вынести эту функцию из-под знака суммирования. На опыте измеряется интенсивность, или квадрат амплитуды:

$$I(S) = F_m F_m^* = f_0^2(S) \sum_{n=1}^{n_e} e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}_n} \sum_{m=1}^{n_e} e^{-2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}_m} = f_0^2(S) \sum_{n=1}^{n_e} \sum_{m=1}^{n_e} e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}_{nm}} \quad (14.29)$$

где n_e — число электронов в молекуле, а $\mathbf{r}_{nm} \equiv \mathbf{r}_n - \mathbf{r}_m$ мы определили как вектор между электронами n и m .

За то время, что требуется для проведения рентгеновских измерений в растворе, каждая молекула повернется вокруг своей оси много раз. Кроме того, разумеется, мы имеем дело с набором макромолекул, в котором в любой момент времени будут представлены все возможные ориентации. Поэтому действительно наблюдаемой величиной является

$$\langle I(S) \rangle = f_0^2(S) \sum_{n=1}^{n_e} \sum_{m=1}^{n_e} \int d\Omega e^{2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}_{nm}} \quad (14.30)$$

Интегрирование проводится по всем возможным взаимным ориентациям каждого вектора $\mathbf{r}_{nm}$ и вектора рассеяния $\mathbf{S}$.

Мы уже вычисляли этот интеграл, когда рассчитывали рассеяние от одиночного сферического атома в гл. 13. Поскольку в интегрировании участвуют все углы, интеграл имеет одинаковое значение при любом выборе n и m . Используя результат, полученный в уравнениях (13.20) и (13.21), приходим к уравнению, называемому формулой Дебая:

$$\langle I(S) \rangle = 4\pi f_0^2(S) \sum_{n=1}^{n_e} \sum_{m=1}^{n_e} [(\sin 2\pi S r_{nm}) / 2\pi S r_{nm}] \quad (14.31a)$$

Заметим, что теперь S — скаляр, поскольку в интеграл вошли все внутримолекулярные угловые зависимости. Это означает, что наблюдаемая интенсивность рассеяния будет функцией только угла рассеяния 2θ между волновыми векторами падающего и наблюдаемого излучения, но не будет зависеть от их ориентации относительно рассеивающего объекта. Этот вывод вполне естествен, так как сам объект не обладает никакой преимущественной ориентацией.

Хотя в уравнении (14.31а) мы выразили молекулярное рассеяние как функцию рассеяния от составляющих молекулу электронов, в некоторых случаях более удобно представить его в «атомном» виде. Если $f_n(S)$ и $f_m(S)$ — атомные рассеивающие факторы атомов n и m и если всего имеется N атомов, то эквивалентной формой уравнения (14.31а) является

$$\langle I(S) \rangle = 4\pi \sum_{n=1}^N \sum_{m=1}^N f_n(S) f_m(S) (\sin 2\pi S r_{nm}) / 2\pi S r_{nm} \quad (14.31б)$$

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ И РАДИУСА ИНЕРЦИИ

Двойная сумма в уравнении (14.31) весьма громоздка. Однако она может быть значительно упрощена в предельном случае при $S \rightarrow 0$. (На самом деле надо рассматривать $S r_{nm} \rightarrow 0$.) Поскольку S равно $2\sin \theta/\lambda$, в лабораторной системе координат это соответствует рассеянию при $\theta \rightarrow 0$. Технически такие эксперименты крайне трудны, так как измерениям при $\theta = 0$ сильно мешает первичный пучок, прошедший сквозь образец. Поэтому необходимо использовать специальные камеры, которые позволяют работать вблизи первичного пучка, не задевая его¹⁾.

Для предельного случая $\theta \rightarrow 0$ каждый член суммы в уравнении (14.31а) можно разложить в ряд, воспользовавшись соотношением $\sin x = x - x^3/3! + x^5/5! - \dots$. Оставляя только первые два члена, получаем

$$\langle I(S) \rangle = 4\pi f_0^2(0) \sum_{n=1}^{n_e} \sum_{m=1}^{n_e} [1 - (2\pi S r_{nm})^2/6] \quad (14.32)$$

где мы заменили $f_0^2(S)$ его значением при $S = 0$. Заметим, что r_{nm}^2 есть не что иное, как квадрат расстояния r_{nm} . Первый член в сумме есть просто $\sum_n \sum_m 1 = n_e^2$. Второй член можно

оценить, если использовать некоторые результаты гл. 18. Там показано, что квадрат радиуса инерции полимера, состоящего из $n + 1$ одинаковых звеньев, есть $R_G^2 = [1/(n + 1)^2] \sum_{i < j} r_{ij}^2$, где r_{ij} — расстояние между звеньями i и j [см. уравнение (18.8)]. Рас-

сматривая макромолекулу как полимер, состоящий из n_e одинаковых электронов, мы можем написать для ее радиуса инерции:

$$R_G^2 = (1/n_e^2) \sum_{n < m} r_{nm}^2 = (1/2n_e^2) \sum_n \sum_m r_{nm}^2 \quad (14.33)$$

¹⁾ Все уравнения в этом разделе получены в предположении, что у нас имеется точечный источник скользящих рентгеновских лучей. На практике, чтобы иметь достаточную рассеянную интенсивность, необходимо использовать источник относительно больших размеров. Это значительно осложняет процедуру анализа экспериментальных данных (Pessen et al., 1973).

Это выражение позволяет нам оценить второй член суммы в уравнении (14.32) как $(2/3)\pi^2 S^2 2n_e^2 R_G^2$. В случае гибкой молекулы R_G будет средним радиусом инерции.

Таким образом, ожидаемое от макромолекулы малоугловое рентгеновское рассеяние есть

$$\langle I(S) \rangle = 4\pi f_0^2(0)n_e^2(1 - 4\pi^2 S^2 R_G^2/3) \quad (14.34)$$

Обычно определяется интенсивность рассеяния, приходящаяся на одну молекулу и отнесенная к интенсивности рассеяния одним электроном в начале координат. Усредненное по всем ориентациям рассеяние от одного электрона при $\theta = 0$ составляет $4\pi f_0^2(0)$. Если мы подставим $2 \sin \theta/\lambda$ вместо S в уравнение (14.34), то относительная интенсивность в расчете на молекулу будет равна

$$\langle I(\theta) \rangle = n_e^2(1 - 16\pi^2 R_G^2 \sin^2 \theta/3\lambda^2) \quad (14.35)$$

Это выражение показывает, что рассеяние на нулевой угол пропорционально квадрату числа электронов или приблизительно квадрату молекулярной массы. Помимо этого зависимость интенсивности от $\sin^2 \theta$ дает радиус инерции.

Часто записывают уравнение (14.35) в несколько иной форме. Заметим, что гауссову функцию при малых значениях аргумента можно разложить как $e^{-x^2/a} = 1 - x^2/a$. Тогда малоугловое рассеяние может быть представлено выражением

$$\ln[I(\theta)/I(0)] = -(4\pi R_G \sin \theta/\lambda)^2/3 \quad (14.36)$$

Такое представление называется зависимостью Гинье. Эта зависимость дает радиус инерции даже в отсутствие информации о молекулярной массе¹⁾.

Рис. 14.10 иллюстрирует простой пример использования данных о радиусе инерции. Из прежних экспериментов следовало, что при pH 4,5 α -лактальбумин должен быть тетрамером, состоящим из 4 димерных субъединиц. Радиус инерции, определенный в результате измерения малоуглового рентгеновского рассеяния, оказался равным $34,4 \pm 0,4 \text{ \AA}$. Эти измерения позволили исключить многие из моделей, возможных для данного тетрамера.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ШИРОКОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ ДЛЯ ВЫБОРА МОДЕЛИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ

Исследуя только рассеяние на малые углы, мы теряем много информации, потенциально содержащейся в данных по рентгеновскому рассеянию от раствора. Альтернативный подход заключается в том, чтобы измерять $\langle I(S) \rangle$ в широком интервале значений S и затем прямо использовать уравнение (14.31) (или эквивалентные формы). Очевидно, что из-за ориентационного усреднения $\langle I(S) \rangle$ содержит недостаточно информации для того, чтобы определить структуру. Вместо этого можно рассматривать различные модели структуры, например сплошные однородные эллипсоиды вращения, и рассчитывать ожидаемое от них рассеяние. Затем результаты расчетов можно сравнивать с результатами измерений.

Рассмотрим простейший из возможных случаев. Допустим, что моделью объекта может служить однородная сфера радиуса R с постоянной электронной плотностью ρ_0 . В

¹⁾ Зависимость Гинье является в действительности лучшим приближением к уравнению (14.31), чем уравнение (14.35), поскольку разложение гауссовой функции $e^{-x^2/a} = 1 - x^2/a + x^4/2a^2$ почти полностью учитывает третий член в разложении $(\sin y)/y = 1 - y^2/6 + y^4/120$. В этом можно убедиться, полагая $a = 3$ и $y = x\sqrt{2}$ [что приводит в соответствие уравнения (14.32) и (14.36)].

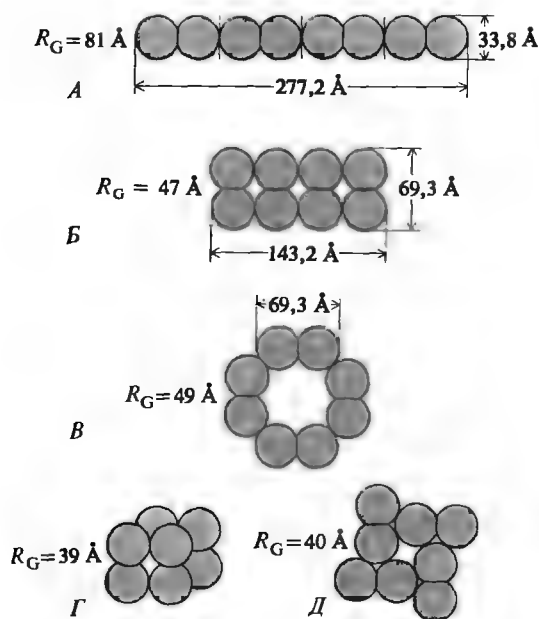


РИС. 14.10. Несколько возможных моделей для тетрамера α -лактальбумина. Для каждой модели указан предсказываемый радиус инерции. Экспериментальное значение R_G , полученное из малоуглового рентгеновского рассеяния, составляет $34 \text{ \AA}$, свидетельствуя о том, что правильной моделью является, по всей видимости, структура Г. [Witz J., Timasheff S.N., Luzzati V., J. Amer. Chem. Soc., 86, 168 (1964).]

этом случае можно рассчитать структурный фактор прямо по уравнению (13.21):

$$\begin{aligned}
 F(S) &= 4\pi\rho_0 \int_0^R [(\sin 2\pi Sr)/2\pi Sr] r^2 dr = \\
 &= 4\pi\rho_0 R^3 \left(\frac{\sin(2\pi SR) - 2\pi SR \cos(2\pi SR)}{(2\pi SR)^3} \right)
 \end{aligned} \quad (14.37)$$

Это просто последовательность пиков чередующегося знака, высота которых уменьшается с ростом S (или 2θ — угла рассеяния; см. Guinier, 1963). Наблюдаемые интенсивности $|F(S)|^2$ представляют собой периодические максимумы с последовательно уменьшающейся величиной. По положению этих максимумов можно определить R .

На рис. 14.11 представлен типичный пример рентгеновского рассеяния в растворе. В области малых углов рассеяние от бактериофага R17 довольно хорошо согласуется с моделью, представляющей собой однородную сферу радиуса $R = 133 \text{ \AA}$. Однако согласие не полное, и необходимы более точные модели.

В общем случае электронная плотность не является константой. Чтобы по $|F(S)|^2$ рассчитать $\rho(r)$, начинают обычно с предположения, что знак $F(S)$ регулярно чередуется от пика к пику. Теперь полученные данные можно прямо использовать для синтеза Фурье. Нам надо получить соотношение, обратное уравнению (13.21). Заметим, что это уравнение может быть записано в виде синус-преобразования Фурье для величины $r\rho(r)$ (см. Дополнение 14.1):

$$SF(S) = 2 \int_0^\infty dr \sin(2\pi Sr) r\rho(r) \quad (14.38)$$

Обратное синус-преобразование Фурье функции $SF(S)$ дает

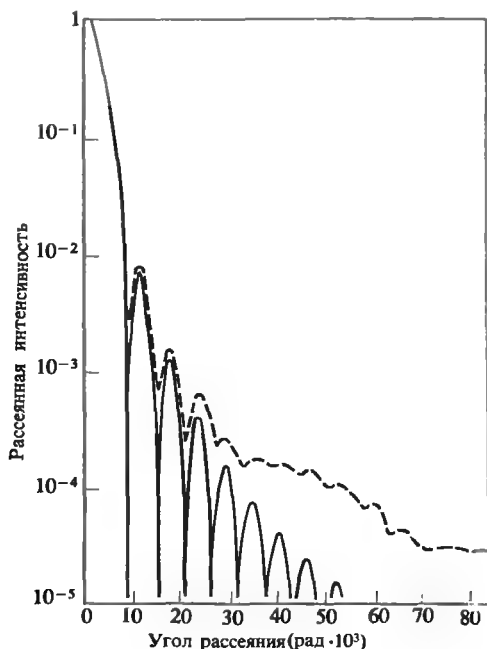


РИС. 14.11. Рентгеновское рассеяние от раствора бактериофага R17 (сплошная кривая) и рассеяние, рассчитанное для однородной сферы радиуса 133 Å (пунктирная кривая). (Pilz I. In: Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry, ed. S. Leach, New York, Academic Press, 1973.)

$$r\rho(r) = (1/\pi) \int_0^\infty dS \sin(2\pi Sr) SF(S) \quad (14.39)$$

Предположение о чередовании знака у соседних пиков означает, что $F(S)$ в уравнении (14.39) заменяется на $|F(S)| \times \text{«знак}(S)\text{»}$, где «знак(S)» меняется от пика к пику. Во многих случаях, например для сферических оболочек или сплошных эллипсоидов, рассеяние будет качественно напоминать описываемое уравнением (14.37). Однако знаки последовательных пиков в $F(S)$ могут уже не чередоваться.

Заметим, что вероятность существования электронной плотности $\rho(r)$ на расстоянии r от начала координат пропорциональна

$$D(r) = r^2 \rho(r) = (r/\pi) \int_0^\infty dS \sin(2\pi Sr) SF(S) \quad (14.40)$$

$D(r)$ называется радиальной функцией распределения.

Дополнение 14.1

СИНУС-ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ФУРЬЕ

Фурье-преобразование функции $f(r)$ определяется как

$$g(S) = \int_{-\infty}^{\infty} f(r) e^{2\pi i S r} dr$$

Пусть $f(r)$ — нечетная функция: $f(r) = -f(-r)$. Тогда ее фурье-преобразование можно переписать как

$$g(S) = \int_0^{\infty} f(r)e^{2\pi i S r} dr - \int_0^{\infty} f(r)e^{-2\pi i S r} dr$$

что легко преобразуется в

$$g(S) = 2i \int_0^{\infty} f(r)(\sin 2\pi S r) dr$$

Обратите внимание, что $g(S)$ — нечетная функция S .

Теперь перейдем к обратному преобразованию Фурье:

$$f(r) = (1/2\pi) \int_{-\infty}^{\infty} g(S)e^{-2\pi i S r} dS$$

Разбивая, как и прежде, интеграл на части, в конце концов получаем

$$f(r) = (-i/\pi) \int_0^{\infty} g(S)(\sin 2\pi S r) dS$$

Эти уравнения могут быть получены в более удобной форме, если ввести $g'(S) = -ig(S)$. Тогда

$$g'(S) = 2 \int_0^{\infty} f(r)(\sin 2\pi S r) dr$$

$$f(r) = (1/\pi) \int_0^{\infty} g'(S)(\sin 2\pi S r) dS$$

Эти результаты называются синус-преобразованием Фурье и обратным синус-преобразованием Фурье соответственно.

РАСЧЕТ РАДИАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ ПАТТЕРСОНА ПО ДАННЫМ РАССЕЯНИЯ В РАСТВОРЕ

Трудность расчета распределения электронной плотности $\rho(r)$ с помощью уравнения (14.39) состоит в том, что неизвестен знак $F(S)$. Это еще один пример фазовой проблемы в рентгеновском рассеянии. Если интенсивности дифракции, измеренные при рассеянии от кристалла, подвергнуть обратному преобразованию Фурье, в результате будет получена функция Паттерсона (гл. 13). Можно показать, что если обратному преобразованию Фурье подвергнуть интенсивности рассеяния от сферически-усредненного объекта, то результатом будет сферически-усредненная функция Паттерсона $\langle P(r) \rangle$.

По аналогии с уравнением (14.39) можно написать

$$r\langle P(r) \rangle = (1/\pi) \int_0^{\infty} dS \sin(2\pi S r) S I(S) \quad (14.41)$$

Поскольку функция Паттерсона дает карту всех межатомных векторов, сферически-усредненная функция Паттерсона будет напоминать эту карту после поворотов ее по всем углам θ и ϕ в сферических координатах. На рис. 14.12 представлен пример для простой молекулы.

На интуитивном уровне весьма трудно почувствовать физический смысл функции $\langle P(r) \rangle$. Гораздо более удобной в этом отношении является *радиальная* функция Паттерсона $U(r)$. По аналогии с уравнением (14.39) имеем

$$U(r) = r^2 \langle P(r) \rangle = (r/\pi) \int_0^{\infty} dS \sin(2\pi S r) S I(S) \quad (14.42)$$

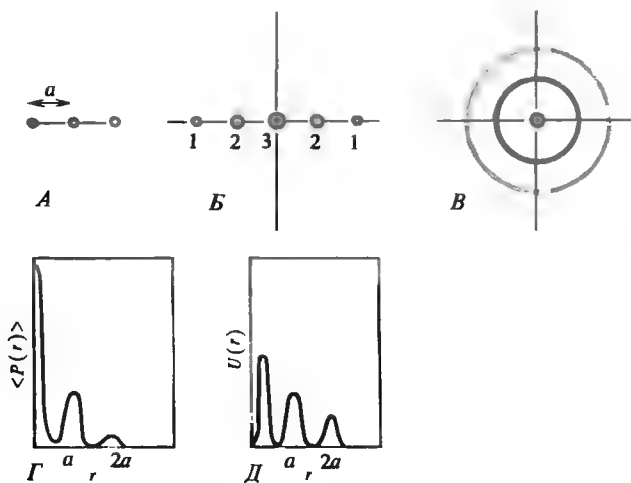


РИС. 14.12. Функции Паттерсона, которые можно рассчитать по данным рассеяния в растворе. А. Линейная трехатомная молекула. Б. Функция Паттерсона для структуры, представленной на фрагменте А. В. Сферическое усреднение функции Паттерсона, показанной на фрагменте Б. Обратите внимание, как резко падает плотность с увеличением радиуса. Г. Радиальное сечение сферически-усредненной функции Паттерсона для молекулы, показанной на А. Д. Радиальная функция Паттерсона для данной молекулы. Эта функция получается, если умножить на r^2 функцию, представленную на предыдущем фрагменте. Обратите внимание, что теперь относительные высоты пиков в точках a и $2a$ пропорциональны относительным вероятностям существования в молекуле межатомных расстояний a и $2a$.

Физический смысл этой функции в том, что она описывает относительную вероятность существования в объекте областей электронной плотности, разделенных расстоянием r . Таким образом, она по своей сути подобна функции Паттерсона, пики которой отвечают максимумам электронной плотности, разделенным вектором $\mathbf{r}$. В некоторых случаях интерпретировать радиальную функцию Паттерсона достаточно легко (см. рис. 14.12, Д).

ТОНКАЯ СТРУКТУРА РАСТЯНУТОГО КРАЯ ПОГЛОЩЕНИЯ (EXAFS)

Наличие источников синхротронного излучения, легко перестраиваемых на нужную длину волны и дающих поток рентгеновских квантов высокой плотности, способствует развитию ряда новых направлений в рентгеновской спектроскопии. Для анализа биологических объектов особенно многообещающим является метод EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure). В этом методе поглощение рентгеновских лучей твердым аморфным или жидким образцом измеряется как функция длины волны в том интервале энергий, который следует сразу за поглощательным переходом в выбранном атоме. Больше всего подходят для этого атомы, которые относительно нечасто представлены в структуре и имеют атомный номер больше ~ 20 .

В интервале энергий, следующем непосредственно за резким краем поглощения, наблюдается серия частых осцилляций. Оказывается, что такая картина является отражением интерференционного эффекта, обусловленного соседними атомами, окружающими атом-поглонитель. В благоприятных случаях, анализируя фурье-преобразование этих осцилляций, можно получить информацию о количестве соседних атомов, об их типах и о расстояниях до них. Обычно требуется параллельное исследование модельных соединений с из-

вестной структурой. В результате может быть получена чрезвычайно точная структурная информация, причем замечательной особенностью метода является то, что структура образца вовсе не обязана быть упорядоченной. Однако информация ограничивается лишь довольно небольшими расстояниями. Метод EXAFS был успешно применен к анализу окружения металлических атомов в ряде металлопротеидов. Так, были получены сведения об окружении атомов железа в рубредоксине и гемоглобине и атомов молибдена в нитрогеназе. В качестве введения в этот перспективный новый метод см. Shulman et al. (1978).

14.3. Рассеяние излучения других видов

Может возникнуть вопрос: почему при описании различных видов рассеяния и дифракции, которые мы до сих пор обсуждали, нам практически не пришлось говорить о физике рентгеновских лучей и их взаимодействии с веществом? Дело в том, что почти все сказанное является весьма общим и приложимо к любому электромагнитному излучению. По существу, все наши уравнения остаются в силе независимо от того, используем ли мы свет, микроволны или гамма-лучи. Однако, поскольку отношение молекулярного размера к длине волны будет в этих случаях совершенно различным, такие виды излучения могут быть не всегда одинаково пригодными.

Пока речь шла о рентгеновских лучах, мы могли представлять молекулу как совокупность отдельных атомов, которые являются сферически-симметричными рассеивающими центрами. В случае света такое представление, строго говоря, неверно. Кроме того, мы в значительной степени игнорировали тот факт, что молекулы неизбежно отличаются от своего окружения (обладают определенным контрастом на фоне растворителя). Для рассеяния света это обстоятельство становится важным. Однако наиболее существенные результаты: представление рассеяния в виде преобразования Фурье и интерференционные эффекты, определяемые парами атомов, — полностью сохраняются, какое бы излучение ни использовалось. На самом деле совсем не обязательно, чтобы это было электромагнитное излучение. Частицы, подобные электронам и нейтронам, обладают свойствами поперечных волн, у которых длина волны зависит от энергии частицы. Таким образом, рассеяние и дифракцию электронов и нейтронов также можно описать ранее полученными уравнениями, внося в них лишь небольшие изменения. В случае электронов и нейтронов атомные рассеивающие факторы должны быть заменены иными характеристиками взаимодействия излучения с веществом.

ПРИГОДНАЯ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЙ ОБЛАСТЬ ДЛИН ВОЛН

Почему нельзя определить кристаллическую структуру, используя рассеяние света? В принципе это дало бы огромное экспериментальное преимущество, поскольку в нашем распоряжении имеются источники когерентного света (лазеры) и, следовательно, существуют прямые способы измерения как интенсивностей, так и фаз. Рассмотрим типичный макромолекулярный кристалл, элементарной ячейкой которого является куб с ребром в $40 \text{ \AA}$. Обратной решеткой будет кубическая система точек с характерным расстоянием $1/40 \text{ \AA}^{-1}$ в каждом из направлений. Пусть в эксперименте по рассеянию используется свет с длиной волны $2000 \text{ \AA}$. Сфера отражения имеет радиус $1/\lambda = 1/2000 \text{ \AA}^{-1}$. Таким образом, в нее попадает лишь один узел обратной решетки — начало координат. Никакой картины дифракции наблюдаться не будет. Если бы элементарная ячейка кристалла была достаточно большой (а обратная решетка достаточно частой), можно было бы проводить структурный анализ, но разрешение было бы низким, потому что доступная для измерений область обратной решетки ограничивается расстоянием, обратно пропорциональным длине волн.

Допустим, с другой стороны, что нам нужно определить радиус инерции вируса. R_G в этом случае вполне может быть равен $1000 \text{ \AA}$ или больше. При рассмотрении рентгеновского малоуглового рассеяния, выводя формулу Гинье [уравнение (14.36)], мы неявно полагали, что $SR_G < 1$. Выполнение этого условия означает, что $\sin \theta < \lambda/R_G$. При длине волны рентгеновских лучей $1 \text{ \AA}$ мы должны были бы проводить измерения в области, где $\sin \theta \cong \theta \cong (1/1000) \text{ рад} = 0,06^\circ$, т.е. в области очень малых углов. В случае же света с длиной волны $6000 \text{ \AA}$ здесь нет никаких проблем. Итак, у разных методов свои относительные преимущества, и все определяется тем, что именно нас интересует. В следующих разделах мы кратко остановимся на специфических возможностях ряда методов, которые по сути подобны методу рентгеновского рассеяния.

14.4. Электронная микроскопия

ИЗМЕРЕНИЕ ЭЛЕКТРОННОЙ ДИФРАКЦИИ ОТ ТВЕРДОГО ТЕЛА С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОННОГО МИКРОСКОПА

Рассмотрим, как с помощью метода электронной дифракции определяется структура тонких образцов в электронном микроскопе. Схема эксперимента представлена на рис. 14.13.

Длина волны электрона (или любой другой частицы) дается соотношением де Бройля

$$\lambda = h/m_e v \quad (14.43)$$

где m_e — масса электрона, v — его скорость, а h — постоянная Планка. Если первоначально покоящиеся электроны ускоряются разностью потенциалов Φ , они приобретают кинетическую энергию $(1/2)m_e v^2 = e\Phi$. Объединяя это выражение с уравнением (14.43) и подставляя соответствующие численные значения для массы электрона, его заряда и для постоянной Планка, получаем

$$\lambda = 12,3/\sqrt{\Phi} \text{ \AA} \quad (14.44)$$

где Φ выражается в вольтах. Отсюда следует, что длина волны электронов, ускоренных в поле $100\,000 \text{ В}$, близка к $0,04 \text{ \AA}$, что вполне подходит для определения структуры молекул. В принципе, поскольку длина волны здесь меньше, чем в случае рентгеновских лучей, структуру можно определять еще точнее. Электронная дифракция в газовой фазе позволяет исключительно точно определять структуру малых молекул. Электроны легко тормозятся или поглощаются в тонких слоях любых веществ, поэтому эксперименты необходимо проводить в вакууме. Образцы обычно помещают на тонкую золотую пленку-подложку. Бомбардировка электронами может вызывать в образце значительные повреждения. Это означает, что допустимы лишь достаточно малые интенсивности облучения, и получающийся в результате контраст между образцом и пленкой-подложкой оказывается низким.

В обычном электронном микроскопе контраст повышают при помощи тяжелых атомов. Однако, как обсуждалось в гл. 10, такое контрастирование приводит к ухудшению разрешения и может, кроме того, быть причиной сильных искажений в исследуемой структуре. Для тех измерений, о которых идет речь ниже, обычно необходимо использовать неконтрастированные образцы. Вдобавок к этому надо следить за тем, чтобы структура не искажалась в результате высушивания, которое требуется при работе в вакууме. Один из способов достичь этого в случае тонких кристаллических срезов состоит в том, чтобы заменить водный растворитель, содержащийся в кристалле, нелетучей жидкостью. Дальнейшее обсуждение касается только такого тонкого образца.

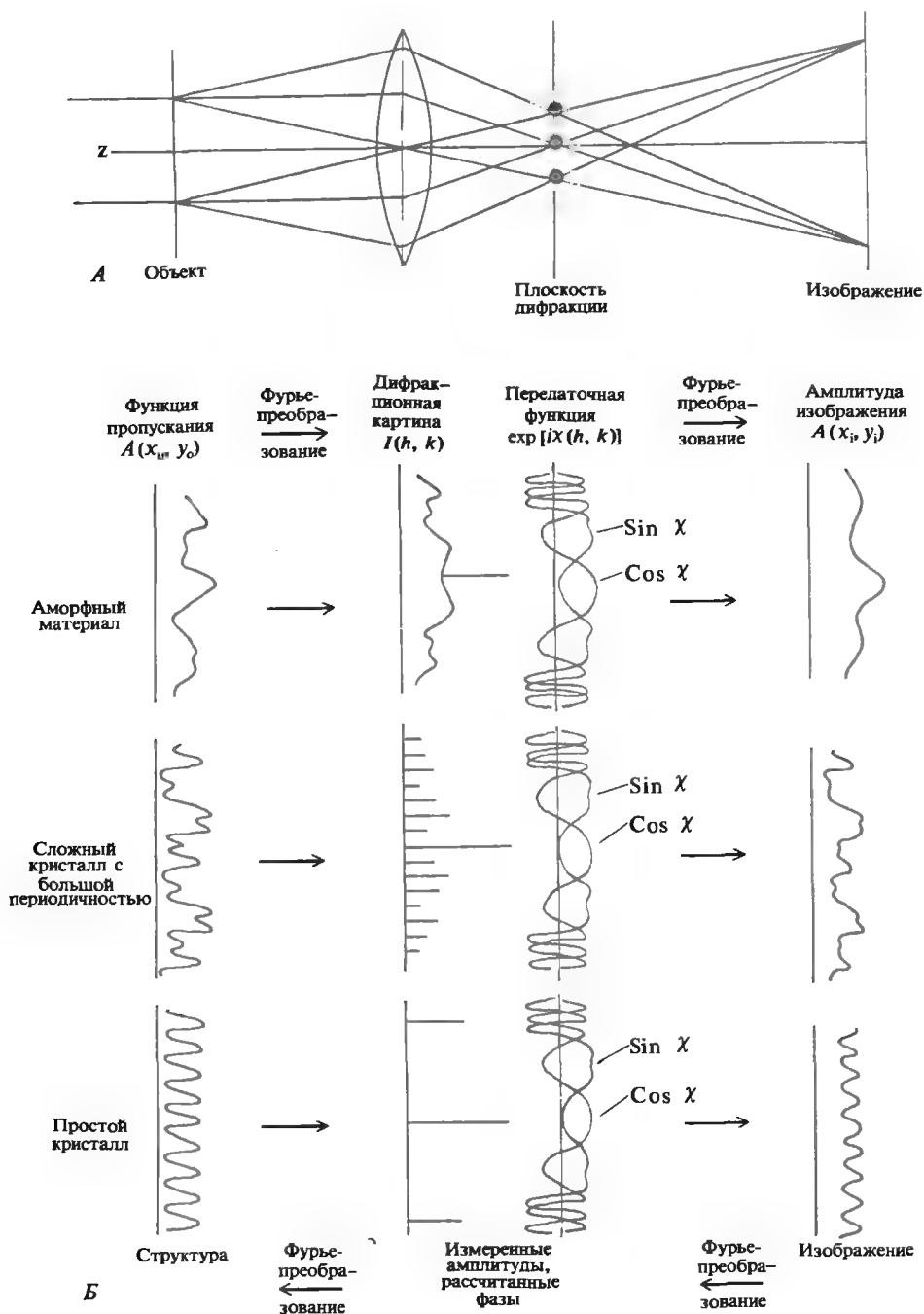


РИС. 14.13 Дифракция электронов и формирование изображения в электронном микроскопе. А. Геометрическая оптика. Б. Волновая оптика. (Crowley J.M., Iijima S., Physics Today, March 1977, p. 32.)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОННОГО МИКРОСКОПА

Наш тонкий образец — это двумерная решетка, расположенная в плоскости, перпендикулярной направлению падения электронов. Вся дифракционная картина будет находиться в плоскости, параллельной плоскости образца¹⁾ (рис. 14.13). Однако эта картина искажена вследствие несовершенства оптики, которая используется для фокусирования электронного пучка. Это искажение представляется передаточной функцией, показанной на рис. 14.13. Последующее фокусирование дифракционной картины дает изображение структуры. Однако это — искаженное изображение, и, кроме того, контраст его низок, так как образец не прокрашен. Даже используя методы фурье-усреднения, описанного в гл. 10, трудно получить структурную информацию с высоким разрешением.

По сравнению с низким качеством изображения качество данных в плоскости дифракции является превосходным, поскольку в них представлено среднее по многим элементарным ячейкам. Видны резкие пятна (рис. 14.14, А). Интенсивности в картине дифракции могут быть точно измерены. Однако, для того чтобы по этой картине воссоздать структуру, нам нужны еще фазы и поправочные множители для передаточной функции. Де Розье и Круг показали, что фазы можно определить, рассчитывая картину дифракции с помощью фурье-преобразования изображения. Затем, зная оценки для фаз и измеренные интенсивности дифракции, можно провести синтез Фурье и получить структуру — в точности так, как это делалось в рентгеновской дифракции.

Первыми, кто выполнил электронно-микроскопическое определение структуры с высоким разрешением на непрокрашенных биологических образцах, были Ануин и Хендерсон. Стадии этого процесса иллюстрируются на рис. 14.14. Объектом исследования является пурпурная мембрана галофильной бактерии. Эта мембрана состоит из липида и преимущественно из одного белка. На рис. 14.14 показаны экспериментальная дифракционная картина, когда плоскость мембраны перпендикулярна пучку электронов (рис. 14.14, А), и часть дифракционной картины, рассчитанной по электронно-микроскопическому изображению (рис. 14.14, Б, В). Кроме того, показана результирующая контурная карта проекции структуры на плоскость мембраны (рис. 14.14, Г). Разрешение, с которым получена эта карта, равно 7 Å, хотя нет никаких серьезных препятствий к тому, чтобы улучшить его. Видны многочисленные интенсивные пики, отстоящие друг от друга на 10 Å. По всей вероятности, это α -спирали белка, видимые с торцов. Следовательно, спирали должны быть ориентированы приблизительно перпендикулярно мембранной поверхности.

Для того чтобы получить трехмерную структурную информацию, весь только что описанный процесс повторяют при различных наклонах образца. Затем структуру восстанавливают по набору двумерных проекций (Henderson, Unwin, 1975).

● МАТЕМАТИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ ДИФРАКЦИИ ЭЛЕКТРОНОВ

Пусть образец лежит в плоскости $x - y$, а электроны падают на него вдоль оси z . Отдельные стадии формирования электронно-микроскопического изображения, которые мы рассмотрим ниже, представлены на рис. 14.15. Существенные моменты заключаются в том, что дифракционная картина является фурье-преобразованием образца, а изображение — фурье-преобразованием дифракционной картины.

Электроны в момент достижения ими образца могут быть представлены волной с единичной амплитудой и нулевой фазой. При прохождении через образец электроны будут

¹⁾ Хотя в действительности картина дифракции является трехмерной, все интересующие нас расстояния значительно превосходят длину волны электронов. Поэтому для всех практических целей кривизной сферы отражения можно пренебречь.

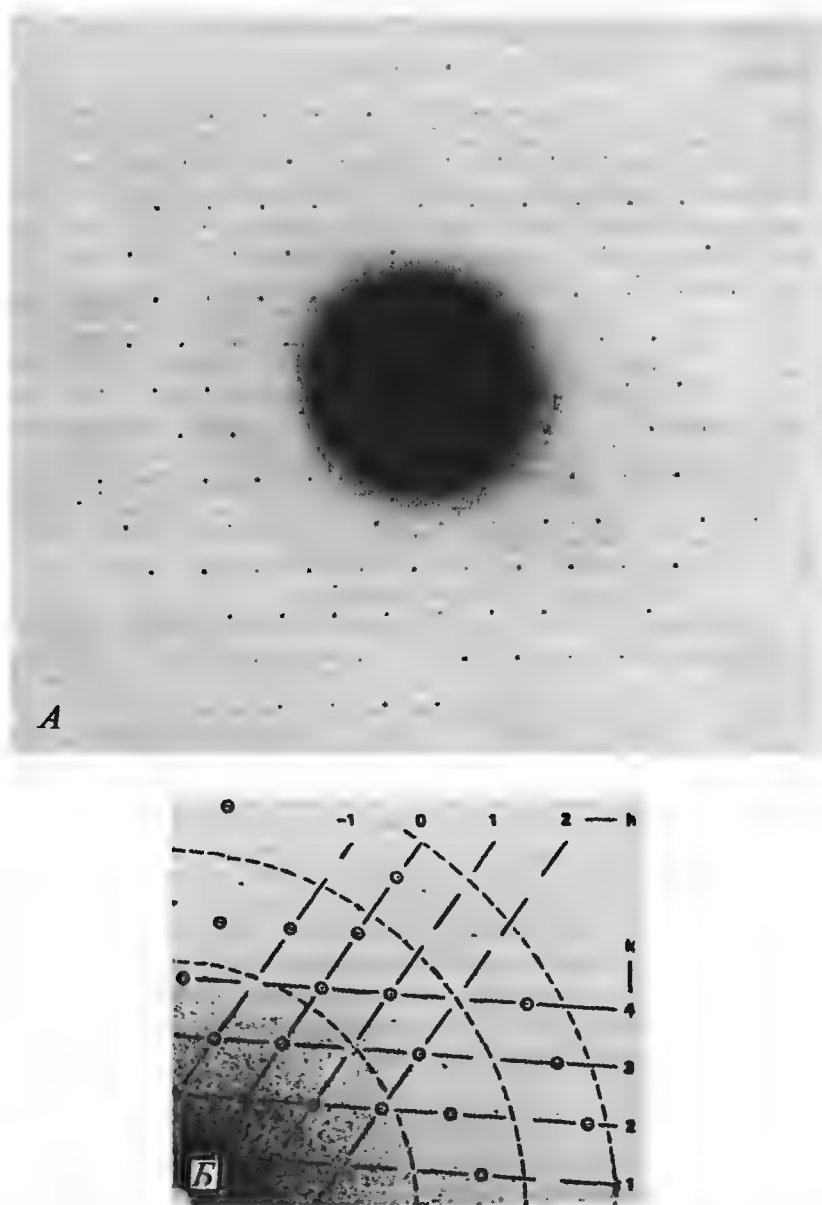
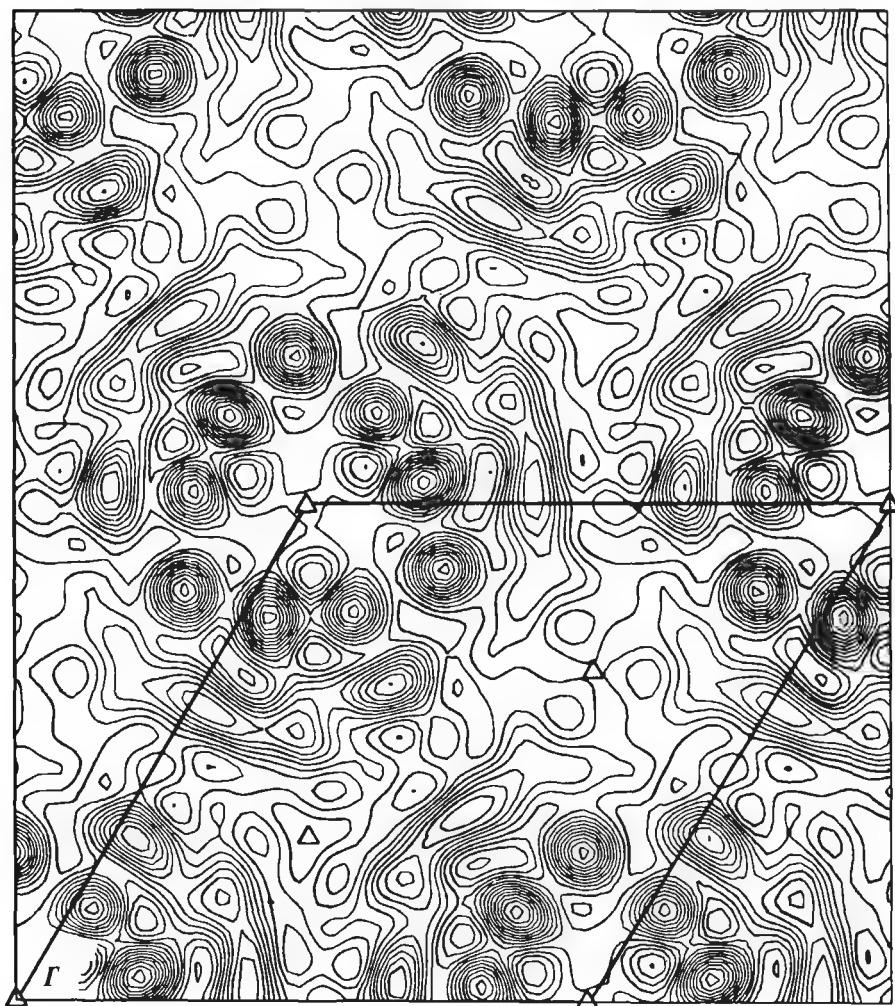
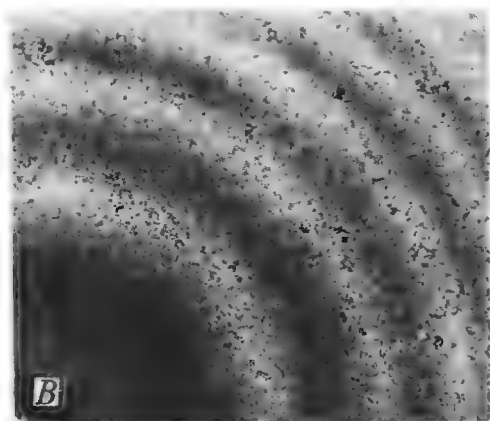


РИС. 14.14. Стадии анализа структуры пурпурной мембраны с помощью дифракции электронов в электронном микроскопе. *А.* Экспериментально наблюдаемая картина дифракции. *Б.* Часть дифракционной картины, полученной в результате фурье-преобразования электронно-микроскопического изображения. Микрограмма, полученная при низкой дозе облучения; показано индцирование некоторых узлов обратной решетки. *В.* Микрограмма, полученная при высокой дозе облучения; ее вид определяется прежде всего передаточной функцией. *Г.* Карта электронной плотности при разрешении 7 Å. Карта получена как результат синтеза Фурье, в котором использовались интенсивности, измеренные в части *А*, и фазы, вычисленные с помощью изображений *Б* и *В*. Размеры элементарной ячейки 62×62 Å. [Unwin P.N.T., Henderson R., J. Mol. Biol., 94, 431 (1975).]



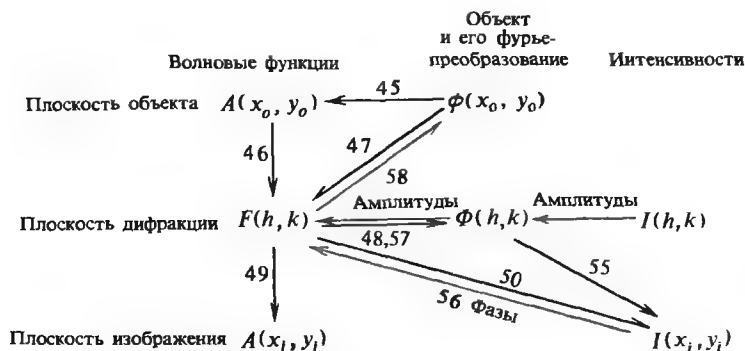


РИС. 14.15. Определение структуры с помощью электронного микроскопа. Показаны «взаимоотношения» между различными наблюдаемыми и вычисляемыми величинами. Числа около стрелок относятся к соответствующим уравнениям в тексте, с помощью которых можно провести указанные расчеты. Коричневыми стрелками отмечены те этапы расчета, которые проходит исследователь при решении структуры.

подвергаться воздействию локального потенциала $\phi(x, y, z)$, источником которого являются электроны и ядра атомов образца. Это приведет к фазовому сдвигу в первоначальной волне. Поскольку образец очень тонкий, нам надо рассматривать только проекцию

$$\text{потенциала на плоскость } x - y: \phi(x, y) = \int_{-\infty}^{\infty} \phi(x, y, z) dz.$$

Фазовый сдвиг, вызванный этим потенциалом, пропорционален его отношению к первоначальному ускоряющему напряжению Φ_0 . Можно показать, что $\delta = \phi(x, y)/2\lambda\Phi_0$. Таким образом, волна, распространяющаяся сразу за объектом, описывается уравнением (14.45) (функция пропускания):

$$A(x_o, y_o) = e^{2\pi i \delta} = e^{i\pi \phi(x_o, y_o)/\lambda\Phi_0} = 1 + i\pi \phi(x_o, y_o)/\lambda\Phi_0 \quad (14.45)$$

Индекс “о” мы использовали здесь для того, чтобы показать, что координаты относятся к объекту, и, кроме того, мы разложили экспоненту, так как влияние поля образца достаточно мало.

Волновая функция электронов в плоскости дифракции $F(h, k)$ (эквивалент структурного фактора) является результатом сложения всех рассеянных волн:

$$F(h, k) = e^{ix} \int_{-\infty}^{\infty} dx_o \int_{-\infty}^{\infty} dy_o e^{2\pi i(x_o h + y_o k)} A(x_o, y_o) \quad (14.46)$$

где h и k , как и в случае рентгеновских лучей, представляют точки обратной решетки. Дополнительный множитель e^{ix} (передаточная функция) должен быть введен для того, чтобы учесть дефокусировку пучка образцом и сферическую aberrацию (см. рис. 14.13).

Действительная часть e^{ix} , т.е. $\cos x$, изменяет амплитуду волн в плоскости дифракции и носит название амплитудного контраста. Мнимая часть, $i \sin x$, изменяет только фазу и называется фазовым контрастом. Параметр x является функцией квадрата угла рассеяния и равняется нулю, когда равны нулю h и k . Уравнение (14.46) напоминает уравнение (13.7) после того, как вводятся условия Лауэ. Эти условия выполняются, так как объект периодичен по x_o и y_o , и эта периодичность приводит к тому, что в результате интерференции рассеяние наблюдается только в точках обратной решетки.

Подставляя приближительное выражение для $A(x_0, y_0)$ из уравнения (14.45) в выражение для $F(h, k)$, получаем

$$F(h, k) = \delta(0, 0) + (i\pi/\lambda\Phi_0)(\cos \chi + i \sin \chi) \int_{-\infty}^x dx_0 \int_{-\infty}^{\infty} dy_0 \phi(x_0, y_0) e^{2\pi i(x_0 h + y_0 k)} \quad (14.47)$$

где функция $\delta(0, 0)$ равняется 1, когда h и k — нули, и равна нулю во всех других случаях. Заметим, что $\delta(0, 0)$ появляется в результате фурье-преобразования константы в уравнении (14.45) и описывает нерассеянный пучок электронов, проходящий через начало координат. Интеграл в уравнении (14.47) — это фурье-преобразование функции $\phi(x_0, y_0)$. Можно обозначить его как $\Phi(h, k)$. Тогда

$$F(h, k) = \delta(0, 0) - (\pi/\lambda\Phi_0)\Phi(h, k)(\sin \chi - i \cos \chi) \quad (14.48)$$

На опыте в плоскости дифракции измеряется интенсивность $I(h, k) = F^*(h, k) \cdot F(h, k)$.

Что получается далее, когда картина дифракции фокусируется на плоскость изображения? Чтобы найти волновую функцию в плоскости изображения $A(x_i, y_i)$, нужно взять волновые функции в плоскости дифракции [уравнение (14.48)] и выполнить синтез Фурье. В результате получим

$$A(x_i, y_i) = \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} e^{-2\pi i(hx_i + ky_i)} F(h, k) \quad (14.49)$$

Индекс i означает, что функция рассматривается в плоскости изображения. Как и прежде, измеряемой величиной является интенсивность AA^* . Ее можно рассчитать как

$$I(x_i, y_i) = \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{h'=-\infty}^{\infty} \sum_{k'=-\infty}^{\infty} e^{-2\pi i(hx_i + ky_i - h'x_i - k'y_i)} F(h, k) F^*(h', k') \quad (14.50)$$

Покажем, что уравнение (14.50) можно существенно упростить. Подставим вместо $F(h, k)$ и $F^*(h', k')$ соответствующие выражения [уравнение (14.48)] и рассмотрим одно слагаемое получающейся суммы. Заметим, что, поскольку $\pi/\lambda\Phi_0$ много меньше, чем $\delta(0, 0)$, членами при $(\pi/\lambda\Phi_0)^2$ можно пренебречь.

$$F(h, k) F^*(h', k') \cong \delta(0, 0) \delta(0', 0') - \delta(0', 0') (\pi/\lambda\Phi_0) \Phi(h, k) (\sin \chi - i \cos \chi) - \delta(0, 0) (\pi/\lambda\Phi_0) \Phi^*(h', k') (\sin \chi' + i \cos \chi') \quad (14.51)$$

Подставляя этот результат в (14.50) и учитывая свойства функций $\delta(0, 0)$ и $\delta(0', 0')$, получаем

$$I(x_i, y_i) = 1 - (\pi/\lambda\Phi_0) \left\{ \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \Phi(h, k) (\sin \chi - i \cos \chi) e^{-2\pi i(hx_i + ky_i)} + \right. \\ \left. + \sum_{h'=-\infty}^{\infty} \sum_{k'=-\infty}^{\infty} \Phi^*(h', k') (\sin \chi' + i \cos \chi') e^{+2\pi i(h'x_i + k'y_i)} \right\} \quad (14.52)$$

Уравнение (14.52) можно существенно упростить. Сначала заметим, что индексы h, k, h' и k' пробегают все целые значения, так что h' и k' можно заменить на h и k ; χ' же можно заменить на χ . Далее заметим, что Φ является фурье-преобразованием объекта, который описывается действительной функцией. Следовательно, Φ подчиняется закону Фриделя [см. уравнения (13.12) — (13.17)]. Таким образом, представляя Φ в виде амплитудной и фазовой составляющих, имеем $\Phi(h, k) = |\Phi(h, k)| e^{i\alpha_{h,k}}$ и можем написать

$$|\Phi(h, k)| = |\Phi(-h, -k)| \quad (14.53a)$$

$$\alpha_{h,k} = -\alpha_{-h,-k} \quad (14.53б)$$

Так как χ зависит только от квадрата угла рассеяния, то

$$\sin \chi(h, k) = \sin \chi(-h, -k) \quad \text{и} \quad \cos \chi(h, k) = \cos \chi(-h, -k) \quad (14.54)$$

Используя все эти результаты, можно переписать уравнение (14.52), заменяя h' на h и k' на k :

$$I(x_i, y_i) = 1 - (\pi/\lambda\Phi_0) \left\{ \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} [|\Phi(h, k)| e^{i\alpha_{h,k}(\sin \chi - i \cos \chi)} + |\Phi(h, k)| e^{i\alpha_{h,k}(\sin \chi + i \cos \chi)}] e^{-2\pi i(hx_i + ky_i)} \right\} \quad (14.55)$$

В итоге можно увидеть, что члены с $\cos \chi$ взаимно уничтожаются. Интенсивность электронно-микроскопического изображения пропорциональна только величине $2|\Phi(h, k)| e^{i\alpha_{h,k} \sin \chi}$. Этот результат справедлив лишь в том случае, если отсутствуют тяжелые атомы. (Дальнейшие детали см. в работе Frank, 1973.)

Величина $I(x_i, y_i)$ описывает изображение, которое действительно получают в электронном микроскопе. Следовательно, нам известно все необходимое для того, чтобы с помощью преобразования Фурье вернуться обратно к плоскости дифракции:

$$F_{\text{выч}}(h, k) = \int_{-\infty}^{\infty} dx_i \int_{-\infty}^{\infty} dy_i e^{2\pi i(x_i h + y_i k)} I(x_i, y_i) \quad (14.56)$$

Однако $I(x_i, y_i)$ — это просто константа плюс синтез Фурье функции $|\Phi(h, k)| e^{i\alpha_{h,k} \sin \chi}$. Поэтому обратное фурье-преобразование в уравнении (14.56) просто «возвращает» нас к функции

$$F_{\text{выч}}(h, k) = \delta(0, 0) - (2\pi/\lambda\Phi_0) |\Phi(h, k)| e^{i\alpha_{h,k} \sin \chi} \quad (14.57)$$

Заметим, однако, что между этим уравнением и уравнением (14.48) есть существенное различие. Из экспериментальной картины дифракции можно получить только амплитуду $\Phi(h, k)$, в то время как по изображению можно рассчитать и амплитуду, и фазу.

В уравнение (14.48) можно ввести фазы, вычисленные из уравнения (14.57), и более адекватные значения для измеренных амплитуд. Тогда фурье-синтез $F(h, k)$ даст функцию $\phi(x_o, y_o)$, описывающую структуру объекта¹⁾:

$$\phi(x_o, y_o) = \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} F(h, k) e^{-2\pi i(x_o h + y_o k)} \quad (14.58)$$

Этот результат относится только к проекции электронной плотности на плоскость, перпендикулярную электронному пучку. Но он изящен и убедителен, поскольку в этом случае удастся решить фазовую проблему.

¹⁾ Строго говоря, в уравнении (14.58) должно стоять $|\Phi(h, k)| e^{i\alpha_{h,k}}$ вместо $F(h, k)$. — Прим. перев.

14.5. Нейтронное рассеяние

СРАВНЕНИЕ НЕЙТРОННОГО И РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЙ

В некоторых ядерных реакторах создаются интенсивные потоки нейтронов. Длина волны этих частиц определяется уравнением (14.43). Практически можно получать почти монохроматические пучки с длинами волн примерно от 2 до 4 Å. Таким образом, рассеяние нейтронов, если рассматривать их как волны, позволяет определять структуру примерно с тем же разрешением, что и дифракция рентгеновских лучей.

Основное неудобство, связанное с использованием нейтронов, состоит в том, что при доступных потоках этих частиц получение интенсивностей рассеяния, достаточных для структурного анализа, требует довольно длительных экспозиций. Кроме того, в настоящее время в мире существует всего несколько реакторов, способных давать подходящие потоки нейтронов с нужной энергией. В то же время у метода нейтронного рассеяния есть определенные преимущества перед рентгеновским рассеянием. Для прямого сравнения нейтронного и рентгеновского рассеяний нам нужно ввести понятие длины рассеяния. Это абсолютная мера рассеивающей способности частицы. Рассмотрим рассеяние рентгеновских лучей одним электроном. Интенсивность, т.е. энергия, излучаемая за единичное время в единицу телесного угла, равна $I_e(\theta) = 7,90 \cdot 10^{-26} I_0 (1 + \cos^2 2\theta)/2$, где 2θ — угол рассеяния, а I_0 — поток энергии через 1 см^2 в падающем пучке (см. Guinier, 1960). Таким образом, константа $7,90 \cdot 10^{-26}$, определяющая действительное количество рассеянной энергии, имеет размерность см^2 . Это — сечение рассеяния, совершенно аналогичное коэффициенту экстинкции (см. Дополнение 7.2).

Если мы напишем соответствующее выражение для амплитуды излучения, то при $2\theta = 0$ будем иметь $|I_e(0)|^{1/2} = 2,8 \cdot 10^{-13} |I_0|^{1/2}$. Константа $2,8 \cdot 10^{-13}$ измеряется в сантиметрах и называется длиной рассеяния электрона. Вспомним, что атомный рассеи-

Таблица 14.2

ДЛИНА НЕЙТРОННОГО И РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ
У РАЗЛИЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

Элемент	Нейтроны $b \cdot 10^{13}, \text{ см}$	Рентгеновские лучи $b \cdot 10^{13}, \text{ см}$
H	−3,74	3,8
D	6,67	2,8
C	6,65	16,9
N	9,40	19,7
O	5,80	22,5
P	5,10	42,3
S	2,85	45
Mn	−3,60	70
Fe	9,51	73
Pt	9,5	220

вающий фактор был определен как амплитуда рассеяния атомом, отнесенная к амплитуде рассеяния электроном. Таким образом, длина рентгеновского рассеяния для атома может быть рассчитана как $b = 2,8 \cdot 10^{-13} f(0)$, где $f(0)$ — значение атомного рассеивающего фактора при нулевом угле рассеяния. Подобным же образом из абсолютных измерений интенсивности рассчитывается длина нейтронного рассеяния.

В табл. 14.2 длины нейтронного рассеяния b для нескольких элементов сравниваются с соответствующими длинами рентгеновского рассеяния. Прежде всего заметим, что у атомов водорода и дейтерия длина нейтронного рассеяния сравнима с длиной рассеяния у других даже тяжелых элементов. Следовательно, водород будет давать существенный вклад в наблюдаемое нейтронное рассеяние, хотя вклад его в рентгеновское рассеяние мал.

Еще замечательнее тот факт, что у атома водорода длина рассеяния отрицательна, в то время как у дейтерия она больше по величине и положительна. Отрицательная длина рассеяния означает, что рассеяние от H сдвинуто по фазе на 180° относительно рассеяния от всех других атомов. Измеряемые интенсивности зависят от b^2 , так что на них не сказывается прямо знак b , но он влияет на величину интерференционных членов, определяемых межатомными векторами, связывающими атом водорода с другими атомами. Кроме того, когда с помощью синтеза Фурье рассчитывается распределение плотности вещества, отрицательная величина b для водорода приводит к отрицательной плотности, а не к положительной, как в случае других атомов. Ниже мы коснемся трех подходов, в которых может быть использовано различие нейтронного рассеяния у водорода и дейтерия.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ АТОМОВ ВОДОРОДА С ПОМОЩЬЮ НЕЙТРОННОЙ ДИФРАКЦИИ В КРИСТАЛЛАХ

Нейтронная дифракция в кристаллах осуществляется точно так же, как рентгеновская дифракция. Однако ввиду того, что длины нейтронного рассеяния различаются у разных атомов не столь сильно, метод изоморфного замещения становится неприменимым. На практике обычно работают с кристаллом, у которого молекулярная структура уже приблизительно установлена другими методами. Затем для того же кристалла измеряют интенсивности нейтронной дифракции. По этим результатам проводят синтез Фурье, в ходе которого используют измеренные нейтронные интенсивности и фазы, вычисляемые с учетом всех неводородных атомов, положение которых в модели структуры известно. На полученной таким образом фурье-карте атомы H и D представлены с гораздо большими весами, чем на карте электронной плотности, ибо весьма велик относительный вклад этих атомов в нейтронное рассеяние. По этой карте можно определить положения H (отрицательная плотность) или D (положительная плотность). Теперь структурная модель может быть дополнена атомами водорода или дейтерия, и при желании можно провести дальнейшее ее уточнение.

Возможна разновидность этого метода, которая состоит в том, что кристалл, образовавшийся в H_2O , перед измерениями выдерживают в D_2O . В этом случае нейтронная дифракция не только позволяет установить, где расположены атомы водорода, но и выявляет те из них, которые способны обмениваться с дейтерием. Поскольку мы знаем из химии, что в таких группах, как NH_2 или OH , протоны обмениваются легко, а протоны CH -группы не обмениваются, подобная информация помогает подтвердить правильность установления структуры. Кроме того, если окажется, что протоны, которые по всем дан-

ным должны обмениваться, в действительности не обмениваются, это послужит указанием на то, что они размещаются в области, недоступной для растворителя.

Полный анализ нейтронной дифракции от макромолекул, подобный только что описанному, проводится не часто, так как это требует очень большого времени работы реактора.

КОНТРАСТ С РАСТВОРИТЕЛЕМ ПРИ НЕЙТРОННОМ И РЕНТГЕНОВСКОМ РАССЕЯНИИ

Нейтронное рассеяние от растворов может быть проанализировано таким же образом, как и малоугловое рентгеновское рассеяние. Из зависимости Гинье [уравнение (14.36)], построенной для малоуглового рентгеновского или нейтронного рассеяния, можно получить радиус инерции рассеивающего объекта в силу того, что рассеяние от него контрастирует с рассеянием от растворителя.

Удобно ввести понятие рассеивающей плотности σ . Для рентгеновских лучей σ пропорциональна электронной плотности, которая в свою очередь пропорциональна атомным рассеивающим факторам. Для нейтронов σ пропорциональна средней длине нейтронного рассеяния для рассматриваемых атомов. В случае рентгеновских лучей можно подбирать рассеивающую плотность растворителя, меняя концентрацию соли и сахаразы в раство-

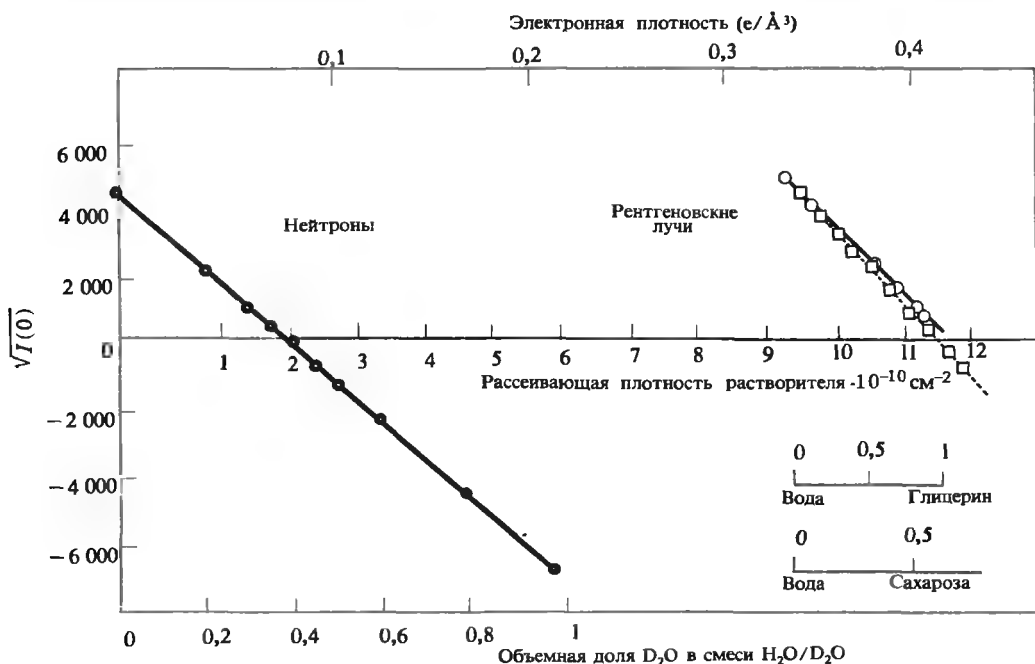


РИС. 14.16. Амплитуда рассеяния от многоглобина в зависимости от контраста между рассеивающими плотностями белка и растворителя. Слева — данные нейтронного рассеяния (●) в смесях H₂O—D₂O. Справа — данные рентгеновского рассеяния в водно-глицериновых (○) и водно-сахарозных (□) растворах. По оси ординат отложен корень квадратный из интенсивности рассеяния при нулевом угле. [Ibel K., Stuhmann H.B., J. Mol. Biol., 93, 255 (1975).]

ре, но область возможного изменения рассеивающей плотности при этом мала. В случае нейтронов контраст между растворенным веществом и растворителем подбирается за счет замены H_2O на D_2O . На рис. 14.16 показано, как рассеивающая плотность растворителя влияет на интенсивность рассеяния от миоглобина, наблюдаемую при нулевом угле рассеяния. Совершенно очевидно, что при использовании нейтронов достижима более широкая область изменения рассеивающей плотности растворителя.

Рассмотрим растворенную макромолекулу, имеющую непроницаемый для растворителя объем V_c . Если рассеивающая плотность в растворе однородна, то никакого рассеяния не наблюдается. Поэтому увеличение рассеивающей плотности вне объема V_c эквивалентно просто уменьшению рассеивающей плотности внутри V_c на постоянную по объему величину. Контраст $\bar{\rho}$ есть средняя разность между рассеивающей плотностью макромолекулы (m) и растворителя (s):

$$\bar{\rho} = \langle \sigma_m \rangle - \langle \sigma_s \rangle \quad (14.59)$$

где угловые скобки означают усреднение по объему макромолекулы. Смысл контраста иллюстрируется наглядно в Дополнении 14.2.

Используя приведенное выше соображение, мы можем представить рассеивающую плотность разбавленного раствора макромолекул в виде суммы двух членов. Один описывает эффект исключения растворителя из объема, занятого макромолекулой; на этолагаемое прямо влияет контраст между макромолекулой и растворителем. В другом слагаемом учтены все возможные изменения рассеивающей плотности внутри макромолекулы.

$$\sigma(\mathbf{r}) = \bar{\rho}\sigma_c(\mathbf{r}) + \sigma_s(\mathbf{r}) \quad (14.60)$$

Функция $\sigma_c(\mathbf{r})$ описывает просто форму поверхности макромолекулы. Она равна 1,0 внутри макромолекулы и 0,0 снаружи. Следовательно, $\int \sigma_c(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = V_c$. Функция $\sigma_s(\mathbf{r})$ определяется внутренней структурой макромолекулы; она описывает все возможные отклонения рассеивающей плотности от $\langle \sigma_m \rangle$. Член $\sigma_s(\mathbf{r})$ не дает вклада при нулевом угле рассеяния, но дает вклад при больших углах (соответствующих меньшим расстояниям)¹⁾.

Структурный фактор вычисляется по уравнению (14.37) при замене электронной плотности $\rho(\mathbf{r})$ рассеивающей плотностью $\sigma(\mathbf{r})$. Используя уравнение (14.60), получаем

$$F(\mathbf{S}) = \bar{\rho}F_c(\mathbf{S}) + F_s(\mathbf{S}) \quad (14.61)$$

где F_c и F_s — фурье-преобразование σ_c и σ_s соответственно. Таким образом, интенсивность рассеяния будет квадратичной функцией ρ :

$$I(\mathbf{S}) = F(\mathbf{S})F^*(\mathbf{S}) = \bar{\rho}^2|F_c(\mathbf{S})|^2 + \bar{\rho}[F_c(\mathbf{S})F_s^*(\mathbf{S}) + F_c^*(\mathbf{S})F_s(\mathbf{S})] + |F_s(\mathbf{S})|^2 \quad (14.62)$$

Однако, поскольку $F_s(\mathbf{S})$ исчезает при $\mathbf{S} = 0$, корень квадратный из интенсивности рассеяния при нулевом угле является линейной функцией ρ : $[I(0)]^{1/2} = \bar{\rho}|F_c(0)|$ (см. рис. 14.16).

ВЛИЯНИЕ КОНТРАСТА НА ИЗМЕРЯЕМУЮ ВЕЛИЧИНУ РАДИУСА ИНЕРЦИИ

Для изучения влияния контраста на измеряемую величину радиуса инерции удобно представить объект с помощью непрерывного распределения рассеивающей плотности.

¹⁾ Если происходит водородно-дейтериевый обмен, то это сказывается как на σ_c , так и на σ_s . Дальнейшие детали см. в работе Stuhmann (1975).

Тогда вместо $R_G^2 = (1/2N^2) \sum_i \sum_j r_{ij}^2$ для N дискретных рассеивающих элементов [уравнение (14.33)] имеем

$$R_G^2 = \int d\mathbf{r} \int d\mathbf{r}' \sigma(\mathbf{r})\sigma(\mathbf{r}')(\mathbf{r} - \mathbf{r}')^2 / 2 \int d\mathbf{r} \int d\mathbf{r}' \sigma(\mathbf{r})\sigma(\mathbf{r}') \quad (14.63)$$

Подстановка сюда уравнения (14.60) дает после некоторого преобразования квадратичное соотношение между контрастом и тем значением R_G^2 , которое может быть получено из измерений рассеяния:

$$R_G^2 = R_c^2 + \alpha/\bar{\rho} - \beta/\bar{\rho}^2 \quad (14.64)$$

Константы в уравнении (14.64) даются следующими выражениями:

$$R_c^2 = (1/V_c) \int \sigma_c(\mathbf{r})\mathbf{r}^2 d\mathbf{r} \quad (14.65a)$$

$$\alpha = (1/V_c) \int \sigma_s(\mathbf{r})\mathbf{r}^2 d\mathbf{r} \quad (14.65б)$$

$$\beta = (1/V_c)^2 \iint \sigma_s(\mathbf{r})\sigma_s(\mathbf{r}')\mathbf{r} \cdot \mathbf{r}' d\mathbf{r} d\mathbf{r}' \quad (14.65в)$$

Здесь R_c — радиус инерции, который наблюдался бы для макромолекулы при бесконечном контрасте; он характеризует форму макромолекулы (см. Дополнение 14.2). Величина α — характеристика внутренней структуры. В частности, если молекулу можно приближенно представить как сердцевину, окруженную сферической оболочкой, то α положительна, когда оболочка плотнее сердцевины, и отрицательна, когда, напротив, сердцевина плотнее оболочки. Параметр β всегда положителен; он описывает смещение наблюдаемого центра масс в зависимости от контраста. В простом случае «сердцевина—оболочка»

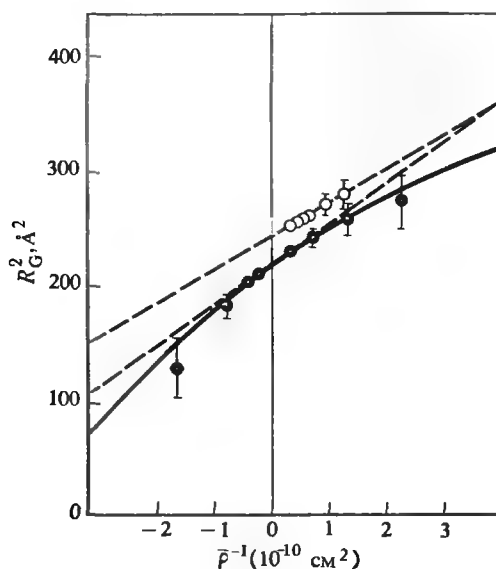


РИС. 14.17. Измеряемый радиус инерции миоглобина, отложенный как функция увеличения контраста между белком и растворителем. Показаны данные как нейтронного (●), так и рентгеновского (○) рассеяния. Пунктирные прямые имеют наклон $R_G^2/\bar{\rho}^{-1}$. Сплошная линия — это ожидаемое рассеяние, вычисленное по известной пространственной структуре миоглобина. [Ibel K., Struhmann H.B., J.Mol. Biol., 93, 255 (1975).]

β увеличивается по мере увеличения расстояния между центрами масс оболочки и сердцевин. Из уравнения (14.64) видно, что R_c^2 есть значение R_G^2 при $1/\rho = 0$; параметр α равен тангенсу угла наклона графической зависимости R_c^2 от $1/\rho$ при $1/\rho = 0$.

На рис. 14.17 показан пример применения уравнения (14.64) к миоглобину. Видно, что величина R_c^2 , полученная из нейтронного рассеяния, немного меньше соответствующей величины, полученной из рентгеновского рассеяния. Причина в том, что сахара и глицерин, используемые для изменения рентгеновского контраста, не могут проникать внутрь белка. Но это возможно для молекул воды при нейтронном рассеянии, о чем свидетельствует небольшой водородно-дейтериевый обмен, наблюдаемый при варьировании отношения H_2O/D_2O . Параметр α положителен для обоих методов. Это вызвано тем, что около поверхности белковой молекулы располагаются преимущественно гидрофильные группы. У этих групп и электронная плотность (а следовательно, рентгеновская рассеивающая плотность), и нейтронная рассеивающая плотность выше, чем у внутренних (гидрофобных) остатков.

Дополнение 14.2

КАК ВЫГЛЯДИТ ОБЪЕКТ ПРИ РАЗНОМ КОНТРАСТЕ

Все виды рассеяния определяются пространственными неоднородностями в структуре образца. Поэтому контраст ρ между плотностью или рассеивающей способностью исследуемого объекта и окружающей его среды может заметно влиять на наблюдаемое рассеяние. В тексте это обстоятельство подробно разбирается в приложении к нейтронному рассеянию, но оно важно при рассмотрении и рентгеновского рассеяния, и рассеяния света.

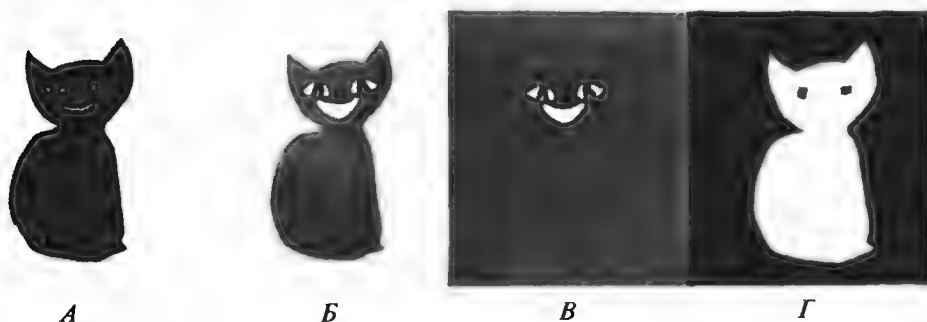


Рисунок служит иллюстрацией того, как вариации контраста между объектом и его фоном могут изменять вид объекта. *А.* Когда контраст ρ велик и положителен, то видна лишь общая форма объекта, но большинство внутренних деталей утеряно. *Б.* Вид объекта в отсутствие какого бы то ни было фона. *В.* Когда $\rho = 0$, общая форма объекта не просматривается и видны только внутренние неоднородности. *Г.* Когда контраст ρ велик и отрицателен, ясно обрисовывается общая форма объекта, но видны лишь некоторые внутренние детали.

КОВАЛЕНТНО ПРИСОЕДИНЕННЫЙ ДЕЙТЕРИЙ В КАЧЕСТВЕ НЕЙТРОННОЙ МЕТКИ

Нейтронное рассеяние позволяет проводить исследования особого рода. Наряду с вариацией состава растворителя можно использовать ковалентное дейтериевое замещение, где

Таблица 14.3

СРЕДНЯЯ ДЛИНА НЕЙТРОННОГО И РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ НА ЕДИНИЦУ ОБЪЕМА¹⁾

Вещество	Нейтроны, $b \cdot 10^{14}, \text{см} \cdot \text{\AA}^{-3}$	Рентгеновские лучи, $b \cdot 10^{14}, \text{см} \cdot \text{\AA}^{-3}$
Полностью протонированные		
H ₂ O	—0,6	9
Белок	3,1	12
Нуклеиновая кислота	4,4	16
Жирная кислота	—0,0	8
Углевод	4,3	14
Полностью дейтерированные		
H ₂ O	6,4	9
Белок	8,5	12
Нуклеиновая кислота	7,4	16
Жирная кислота	6,9	8
Углевод	8,1	14

¹⁾ Engelman D. M., Moore P. B., Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 4, 219 (1975).

дейтерий играет роль метки, которая существенно увеличивает или уменьшает вклады, вносимые в рассеяние различными компонентами структуры. В табл. 14.3 приведены типичные средние длины рассеяния для некоторых дейтерированных или протонированных объектов. Предположим, что объект состоит из двух компонент 1 и 2, которые преимущественно помечены, один — водородом, а другой — дейтерием. Подбирая (H₂O—D₂O)-состав растворителя, можно найти такие условия, когда $\langle \sigma_1 \rangle \cong \langle \sigma_s \rangle$ или $\langle \sigma_2 \rangle \cong \langle \sigma_s \rangle$. В этом случае рассеяние от одного из компонентов подавляется, и мы наблюдаем лишь другой компонент.

На практике измерения осложняются тем обстоятельством, что одни протоны обмениваются с растворителем, а другие — нет. Этот эффект требует введения соответствующих поправок. Кроме того, чтобы перейти от измеренных рассеивающих плотностей к реальной структурной информации, например функции радиального распределения массы, мы должны достаточно много знать о химическом составе объекта.

Рассмотрим объект, у которого два преимущественно дейтерированных компонента входят в состав в целом недейтерированной структуры. Например, таким объектом могла бы быть реассоциированная рибосомная частица, где дейтерированными являются только два белка, а все остальные белки и 16S-pHK не дейтерированы. Сравним интенсивность рассеяния $I_{12}(S)$, ожидаемую для такой частицы, с интенсивностями для частицы, у которой дейтериевое замещение проведено либо только для первого, либо для второго из двух выделенных белков, $I_1(S)$ и $I_2(S)$, и с интенсивностью $I(S)$ для полностью недейтерированной 30S-частицы.

Полные интенсивности будут содержать вклад от недейтерированной частицы $I(S)$, дополнительные вклады от каждого из дейтерированных компонентов, $i_1(S)$ и $i_2(S)$, а также вклады за счет интерференции: как между каждым дейтерированным компонентом и частицей как целым, $C_1(S)$ и $C_2(S)$, так и между самими дейтерированными компонентами $C_{12}(S)$. Таким образом, можно написать

$$I_{12}(S) = I(S) + i_1(S) + i_2(S) + C_1(S) + C_2(S) + C_{12}(S) \quad (14.66a)$$

$$I_1(S) = I(S) + i_1(S) + C_1(S) \quad (14.66б)$$

$$I_2(S) = I(S) + i_2(S) + C_2(S) \quad (14.66в)$$

Решая эти три уравнения относительно C_{12} , получаем

$$C_{12}(S) = I_{12}(S) + I(S) - I_1(S) - I_2(S) \quad (14.67)$$

Поскольку каждую из величин в правой части уравнения (14.67) можно измерить, C_{12} (белок-белковая интерференция) определяется прямо из эксперимента.

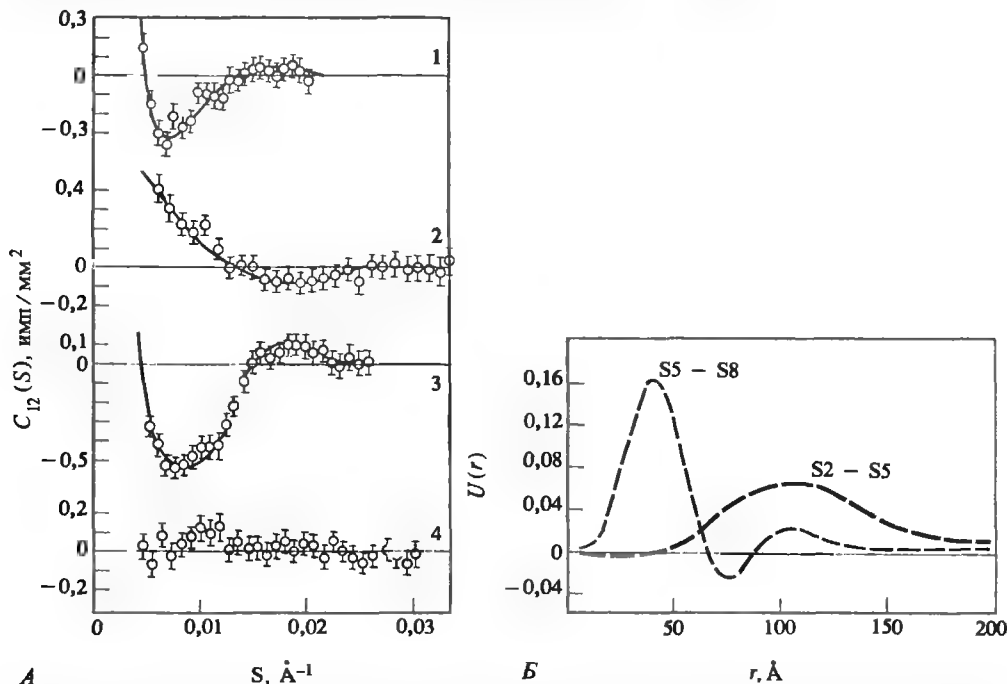


РИС. 14.18. Нейтронное рассеяние от 30S-частицы рибосом *E.coli*, где два белка дейтерированы, а все остальные рибосомные составляющие содержат обычный водород. А. Интерференционный член $C_{12}(S)$ для случаев, когда дейтерированы пары белков S2 и S5 (кривая 1), S5 и S8 (кривая 2), S3 и S7 (кривая 3) и когда вовсе нет дейтерированных белков (кривая 4.). Член $C_{12}(S)$ определяется уравнениями (14.67) и (14.68). Б. Радиальная функция Паттерсона, которая получается из данных, представленных кривыми 1 и 2 на рис. А. Для пары белков S5 и S8 распределение межбелковых расстояний является узким, указывая на то, что каждый из белков является компактной структурой и что они расположены близко друг к другу. В противоположность этому у пары белков S2 и S5 распределение расстояний широкое и указывает на то, что по крайней мере один из белков имеет вытянутую конформацию. [Engelman D., Moore P., Schoenborn B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3887 (1975).]

В простом случае двух сферических белков эта интерференция может быть описана как

$$C_{12}(S) = 2(\sigma_{\text{белок}} - \sigma_{\text{рибосома}})^2 F_1(S)F_2(S) \sin(2\pi d_{12}S)/2\pi d_{12}S \quad (14.68a)$$

где F_1 и F_2 — сферически-усредненные структурные факторы двух отдельных сфер [«нейтронная» аналогия уравнения (14.37)], а d_{12} — расстояние между их центрами. $\sigma_{\text{белок}}$ и $\sigma_{\text{рибосома}}$ — это соответственно средние нейтронные рассеивающие плотности двух выделенных белков и остальной части рибосомы. Мы не будем давать вывода этого уравнения (см. задачу 14.1), но, сравнивая его с уравнением (14.31), можно по крайней мере «примириться» с множителем $\sin(2\pi d_{12}S)/2\pi d_{12}S$. Он показывает, что интерференционный член как функция S представляет собой последовательность максимумов и минимумов. Первое нулевое значение появится при $S = 1/2d_{12}$, что позволяет легко оценить d_{12} .

На рис. 14.18, А представлены результаты определений $C_{12}(S)$ для нескольких пар рибосомных белков 30S-частицы. Поведение $C_{12}(S)$ полностью соответствует уравнению (14.68a). Например, первый нуль в интерференционном члене для пары белков S5 и S8 появляется при $S = (1/70) \text{ \AA}^{-1}$, что отвечает $d_{12} = 35 \text{ \AA}$. Если учесть размеры белков S5 и S8, то это вполне согласуется с тем, чего следует ожидать для двух белков, находящихся в тесном контакте.

Заметим, что величину $C_{12}(S)$ можно подвергнуть синус-преобразованию Фурье. По аналогии с тем, что мы показали в этой главе ранее, такое преобразование приводит к радиальной функции Паттерсона:

$$U(r) = (r/\pi) \int_0^\infty dS C_{12}(S) S \sin 2\pi Sr \quad (14.68b)$$

Функция $U(r)$ дает вероятность существования межбелковых векторов с длиной r . Зная $U(r)$, можно судить о некоторых деталях формы и ориентации белков. Два соответствующих примера иллюстрируются на рис. 14.18, Б.

14.6. Рассеяние света

Мы рассмотрим здесь более или менее детально лишь классическое упругое рассеяние света. Метод светорассеяния является близкой аналогией рентгеновского и нейтронного рассеяния в растворе. Образец освещают коллимированным пучком света с длиной волны λ , и измеряют интенсивность рассеянного излучения с той же длиной волны как функцию 2θ — угла между падающим пучком и направлением, в котором помещен детектор.

ОДИНОЧНЫЕ МОЛЕКУЛЫ, РАЗМЕР КОТОРЫХ МНОГО МЕНЬШЕ ДЛИНЫ ВОЛНЫ

Классическое рассеяние света носит название рэлеевского рассеяния. В пределе, при бесконечном разбавлении и малом угле рассеяния, оно будет описываться уравнением того же вида, что и уравнение (14.34). В принципе рассеяние света и рентгеновское рассеяние суть одно и то же явление. Однако удобно заменить одноэлектронный рассеивающий фактор в уравнении (14.34) величиной, непосредственно измеряемой на опыте. Кроме того, необходимо в полной мере учитывать эффект контраста между растворенным веществом и растворителем, как это было сделано для нейтронного рассеяния.

Свет, падающий на молекулу, размеры которой много меньше длины волны, вызывает появление осциллирующего электрического диполя $\mu = \alpha E$, где E — вектор напряженности электрического поля световой волны, а α — поляризуемость (см. гл. 7). Этот осциллирующий диполь и является источником рассеянного излучения. Можно показать, что ин-

тенсивность I рассеянного излучения (энергия, проходящая через щель площадью 1 см^2 в единицу времени) есть

$$I = I_0(8\pi^4\alpha^2/\lambda^4r^2)(1 + \cos^2 2\theta) \quad (14.69)$$

где 2θ — угол между падающим и рассеянным лучами, λ — длина волны, r — расстояние между образцом и детектором, I_0 — интенсивность падающего света.

Интересующийся читатель с хорошей подготовкой в области электричества и магнетизма может найти подробный вывод уравнения (14.69) в других источниках (см. Верне, Ресога, 1976). Здесь мы только попытаемся качественно объяснить присутствие некоторых входящих в него величин. Поскольку детектор находится достаточно далеко от образца, телесный угол, под которым образец виден сквозь щель фиксированного размера, уменьшается как квадрат расстояния. Этим объясняется появление величины $1/r^2$. Амплитуда световой волны, излучаемой диполем, линейно зависит от ускорения, которое имеют образующие этот диполь заряды. Из соображений размерности разумно предположить, что оно будет меняться как квадрат частоты излучения. Следовательно, интенсивность рассеянного излучения (квадрат амплитуды) будет зависеть от ν^4 , или от λ^{-4} . Подобно этому амплитуда линейно зависит от величины индуцированного дипольного момента μ , так что интенсивность будет зависеть от μ^2 или от α^2 .

Зависимость измеренной интенсивности от λ^{-4} является указанием на то, что наблюдается именно рэлеевское рассеяние, а не поглощение, рамановское рассеяние или другие эффекты. Однако, когда в образце содержатся молекулы, размер которых превышает λ , эта зависимость перестает в точности выполняться. Например, в случае очень длинных стержней зависимость рассеяния от длины волны лучше описывается функцией $f(\lambda^{-3})$.

Заметим, между прочим, что зависимость рэлеевского рассеяния от λ^{-4} объясняет, почему небо голубое, а закаты оранжевые

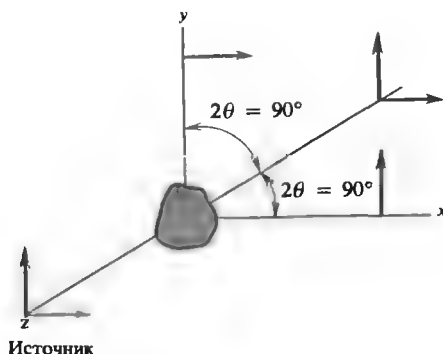
ВЛИЯНИЕ ПОЛЯРИЗАЦИИ НА УГЛОВОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ РАССЕЯННОГО СВЕТА

Слагаемое $1 + \cos^2 2\theta$ в уравнении (14.69) возникает из-за ограничений, которые определяются соотношениями между направлением распространения света и направлением его поляризации. Рассмотрим неполяризованный свет, падающий вдоль оси z (рис. 14.19). В соответствии с описанием, данным в гл. 8, такой свет можно представить в виде суперпозиции компонентов, поляризованных вдоль x и y .

Падающий свет, поляризованный вдоль оси x , будет индуцировать диполь, который осциллирует в направлении x . Рассеянный свет может распространяться вдоль оси z или y . Однако рассеянный свет с x -поляризацией не может распространяться вдоль оси x . Свет — это поперечная волна, и поле в такой волне не может быть ориентировано вдоль направления ее распространения. Основываясь на этих соображениях, можно заключить, что возбуждающий свет с y -поляризацией будет индуцировать рассеянное излучение с такой же поляризацией, распространяющееся вдоль осей x и z , но вдоль оси y рассеяния не будет.

Эти поляризационные эффекты означают, что интенсивность рассеяния, наблюдаемого вдоль x и y , будет составлять половину интенсивности рассеяния, наблюдаемого вдоль z . Это и учитывается членом $1 + \cos^2 2\theta$. Если свет падает вдоль z , то для рассеяния в этом направлении $2\theta = 0$ и $\cos^2 2\theta = 1$. Для рассеяния вдоль осей x или y угол 2θ составляет 90° , и $\cos^2 2\theta = 0$. Между прочим, в точности то же самое происходит и при рассеянии рентгеновских лучей, так что перед тем, как пользоваться уравнениями, полученными в гл. 13 и 14, необходимо скорректировать наблюдаемые интенсивности с учетом этого эффекта.

РИС. 14.19. Рассеяние света от частицы (показанной схематически в центре рисунка) в случае двух возможных направлений поляризации падающего излучения. Заметьте, что в случае неполяризованного света в рассеянии на 90° может давать вклад только одна из двух исходных поляризованных возбуждающих компонент. Следовательно, интенсивность его может составлять самое большее половину от интенсивности рассеяния на угол 0° .



НАБОР МОЛЕКУЛ, РАЗМЕР КОТОРЫХ МНОГО МЕНЬШЕ ДЛИНЫ ВОЛНЫ

Все предыдущее рассмотрение относилось к одиночной рассеивающей частице. Если в исследуемом объеме раствора содержится N одинаковых частиц, то

$$I = I_0 N (8\pi^4 \alpha^2 / \lambda^4 r^2) (1 + \cos^2 2\theta) \quad (14.70)$$

Удобно преобразовать это соотношение к такому, чтобы в нем было представлено как можно больше экспериментально измеряемых величин. Рэлеевское отношение R_θ — это относительная интенсивность рассеянного света. Оно определяется выражением

$$R_\theta = \frac{r^2}{V(1 + \cos^2 2\theta)} \left(\frac{I}{I_0} \right) \quad (14.71)$$

где V — объем исследуемого раствора. Таким образом, с помощью уравнений (14.70) и (14.71) результаты эксперимента по рассеянию света можно представить в следующем виде:

$$R_\theta = (8\pi^4 \alpha^2 / \lambda^4) N' \quad (14.72)$$

где N' есть N/V — концентрация частиц.

Поляризуемость α обычно прямо не измеряется. Кроме того, нас интересует только избыточная (по отношению к чистому растворителю) поляризуемость раствора, поскольку обычно измеряется избыточная рассеянная интенсивность. Избыточная поляризуемость связана с разностью между диэлектрическими постоянными раствора ϵ и чистого растворителя ϵ_0 :

$$\epsilon - \epsilon_0 = 4\pi N' \alpha \quad (14.73)$$

В случае разбавленного раствора левую часть уравнения (14.73) можно разложить в степенной ряд по массовой концентрации c . Оставляя в разложении только первый член, имеем

$$\epsilon - \epsilon_0 = c \partial \epsilon / \partial c \quad (14.74)$$

Концентрация растворенного вещества N' связана с массовой концентрацией соотношением $N' = cN_0/M$, где M — молекулярная масса, а N_0 — число Авогадро. Используя это соотношение, можно написать для поляризуемости [с учетом уравнений (14.73) и (14.74)]

$$\alpha = (1/4\pi)(M/N_0) \partial \epsilon / \partial c \quad (14.75)$$

Так как частоты излучения лежат в оптическом диапазоне, диэлектрическую постоянную ϵ можно заменить на n^2 , где n — показатель преломления. Тогда для разбавленного раствора

$$\partial \epsilon / \partial c = \partial (n^2) / \partial c = 2n(\partial n / \partial c) \cong 2n_0(\partial n / \partial c), \quad (14.76)$$

где n_0 — показатель преломления чистого растворителя, а $\partial n / \partial c$ называют инкрементом показателя преломления. Обе эти величины могут определяться экспериментально, и, используя их, можно переписать уравнение (14.72) в окончательном виде как

$$R_\theta = (2\pi^2 n_0^2 / N_0 \lambda^4) (\partial n / \partial c)^2 M c \equiv K M c \quad (14.77)$$

Все величины, входящие в R_θ и в константу K , могут быть измерены по отдельности. Таким образом, можно определить величину $M c$ н, если известно c , вычислить молекулярную массу.

Если образец представляет собой гетерогенную смесь молекул с молекулярными массами M_i и концентрациями c_i г · см⁻³, то экспериментально измеряемое рассеяние света даст величину $\sum_i M_i c_i$. Так как суммарная массовая концентрация ($c_{\text{сумм}} = \sum_i c_i$) обычно известна, можно рассчитать средневесовую молекулярную массу $\bar{M}_w = \sum_i M_i c_i / \sum_i c_i$.

МОЛЕКУЛЫ, РАЗМЕР КОТОРЫХ СРАВНИМ С ДЛИНОЙ ВОЛНЫ

Все предыдущее рассмотрение справедливо только для макромолекулы, размер которой намного меньше длины волны света. Когда молекулярные размеры оказываются заметными по сравнению с длиной волны λ , то так же, как и в малоугловом рентгеновском рассеянии, в рассеянии света становятся существенными эффекты внутримолекулярной интерференции. Можно считать, что эти эффекты описываются непосредственно уравнением (14.35) (физика явления та же самая), только вместо $\langle I(\theta) \rangle$ нужно использовать величину R_θ , в которой учитываются поляризация и геометрия эксперимента. Вместо величины n_e^2 , которая стоит в уравнении (14.35), мы воспользуемся величиной $K M c$, введенной в уравнении (14.77). В результате рассеяние света для больших частиц будет описываться соотношением

$$R_\theta = K M c (1 - 16\pi^2 R_G^2 \sin^2 \theta / 3\lambda^2) \quad (14.78)$$

Обычно этот результат представляют в форме, удобной для экстраполяции к бесконечному разбавлению:

$$\lim_{c \rightarrow 0} \frac{K c}{R_\theta} = \frac{1}{M} \left(1 + \frac{16\pi^2 R_G^2 \sin^2 \theta}{3\lambda^2} \right) \quad (14.79)$$

Перемена знака при члене, обусловленном внутримолекулярной интерференцией, связана с использованием приближения $1/(1-x) \cong 1+x$ для малых x . Уравнение (14.79) служит основой для построения графика Зимма, который в большинстве случаев применяется для анализа данных рассеяния света. Оно справедливо только для данных, экстраполированных к нулевому углу (когда справедливо приближение, используемое при рассмотрении внутримолекулярной интерференции) и к нулевой концентрации (когда можно пренебречь

межмолекулярной интерференцией). На самом деле отношение Kc/R_θ должно быть измерено в зависимости от угла рассеяния 2θ . В результате получается сетка из точек (рис. 14.20). Часто для того, чтобы разнести точки на более удобное для анализа расстояние (и учесть межмолекулярные эффекты), к $\sin^2\theta$ добавляется произвольная константа $K's$. Затем данные экстраполируются отдельно к $s = 0$ и $\theta = 0$. Пересечение двух экстраполированных кривых дает молекулярную массу M . Начальный наклон кривой, экстраполированной к $s = 0$, можно связать с R_G^2 . Таким образом, рэлеевское рассеяние в принципе является очень мощным методом, ибо с его помощью можно получить как молекулярную массу, так и радиус инерции. Основная трудность в применении рассеяния света связана с присущей ему высокой чувствительностью ко всякого рода примесям, обладающим большой молекулярной массой. Поэтому необходимо уделять особое внимание тому, чтобы избавиться от молекулярных агрегатов или частиц пыли.

ДРУГИЕ ТИПЫ РАССЕЯНИЯ СВЕТА

Два других типа рассеяния света, которые могут давать много полезной информации, — это комбинационное и динамическое рассеяния света. Оба они являются примерами неупругого рассеяния, в них измеряется рассеянное излучение, в котором длины волн отличаются от тех, что представлены в падающем пучке.

При комбинационном рассеянии наблюдается излучение с энергиями, равными энергиям в падающем пучке плюс-минус энергия колебательных квантов. Из распределения рассеянного излучения по длинам волн можно получить информацию о колебательных энергетических уровнях растворенных макромолекул (см. гл. 8).

При динамическом рассеянии света измеряется рассеянное излучение с длинами волн, лишь немного отличающимися от длины волны в падающем пучке. Возникновение такого рассеяния может объясняться несколькими причинами. Например, движущиеся молекулы будут изменять длину волны излучения вследствие эффекта Доплера. Но даже если движение как таковое отсутствует и имеют место только конечные смещения молекул, то и они будут приводить к некоторому распределению длин волн рассеянного света. Это распределение очень узкое, и для его изучения требуется чрезвычайно монохроматичный источник света, а именно лазер.

Динамическое рассеяние света позволяет прямо определять коэффициент диффузии макромолекул в растворе. Спектр рассеянного света, обусловленный случайной диффузией, представляет собой распределение Лоренца:

$$I(S, \nu) = \frac{\langle N \rangle}{\pi} \left(\frac{S^2 D}{4\pi^2 \nu^2 + (S^2 D)^2} \right) \quad (14.80)$$

где ν — частота света, $\langle N \rangle$ — среднее число макромолекул в исследуемом объеме, $S = 2 \sin\theta/\lambda$, а D — коэффициент диффузии. Полуширина частотного распределения рассеянного света составляет $S^2 D$. Таким образом, измеряя полуширину как функцию $\sin^2\theta$, можно получить коэффициент диффузии.

Краткие выводы

Для исследования объектов, которые не обладают периодической трехмерной структурой, существуют различные методы, использующие рассеяние излучения. Из стержнеобразных или спиральных молекул формируются упорядоченные волокна. Анализ рентгеновской дифракции от таких волокон обычно позволяет определить шаг спирали и число остатков на виток. Картина дифракции не содержит достаточно информации для того,

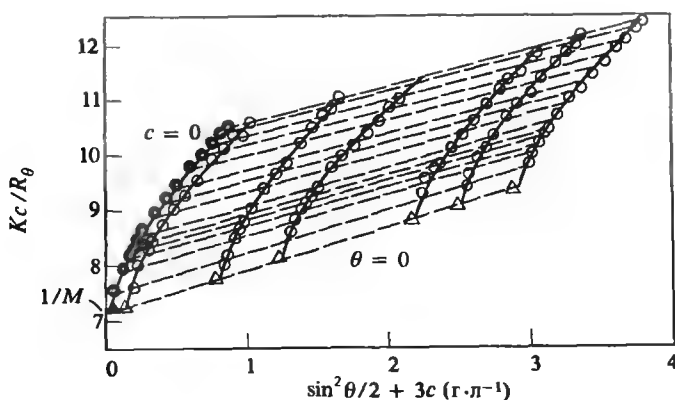


РИС. 14.20. График Зимма для рассеяния света от растворов рРНК из опухолевых асцитных клеток. Точки, нанесенные на график, представляют: экспериментальные данные ($\circ$), результат экстраполяции к нулевой концентрации ($\bullet$) и к $\theta = 0$ ($\triangle$). [Kronman M.J. et al., Biochim. Biophys. Acta, 40, 410 (1960).]

чтобы прямо рассчитать детальную структуру. Однако эту картину можно использовать в качестве теста при выборе лучшей из возможных моделей структуры. Кроме того, в ней содержится некоторая информация об упаковке молекул в волокне.

Двумерные упорядоченные структуры, такие, как тонкие кристаллы или кристаллические мембраны, исследуют с помощью электронного микроскопа. Для одного и того же образца можно получить и картину электронной дифракции, и прямое изображение. Для оценки фаз структурных факторов это изображение подвергают преобразованию Фурье. Совместно с амплитудами, полученными из дифракционных данных, эти фазы используют при синтезе Фурье, результатом которого является детальный «портрет» структуры, полученный с высоким разрешением.

При исследовании макромолекул в растворе методы, использующие рассеяние, имеют дело со сферически-усредненными структурами. Все виды рассеяния: рентгеновское, нейтронное и рассеяние света — описываются одними и теми же основными уравнениями. По интенсивности рассеяния при нулевом угле можно определить молекулярную массу. Угловая зависимость интенсивности рассеяния вблизи нулевого угла дает радиус инерции исследуемого объекта. Измерения рассеяния в широкой области углов могут быть использованы для расчета радиальной функции Паттерсона объекта. Эта функция дает вероятность нахождения внутри объекта двух точек, разделенных расстоянием r . Сравнение расчетной и экспериментальной картин рассеяния позволяет выбрать наиболее подходящую из возможных моделей структуры.

Рассеяние нейтронов обладает тем преимуществом, что атомы водорода участвуют в нем наравне со всеми другими атомами, причем рассеяние от водорода и от дейтерия существенно различается. Последнее обстоятельство дает возможность использовать изотопное замещение, при котором дейтерий служит своеобразной меткой, позволяющей выявлять в структуре отдельные компоненты. В нейтронном рассеянии и в рассеянии света основной характеристикой является контраст между рассеивающей молекулой и растворителем; эта характеристика может быть важной и при интерпретации рентгеновского рассеяния.

Задачи

14.1. Покажите, что для объекта, состоящего из двух сферических белков, разделенных расстоянием d_{12} , интенсивность рентгеновского рассеяния в растворе равна

$$I(S) = |F_1(S)|^2 + |F_2(S)|^2 + 2F_1(S)F_2(S) \sin(2\pi d_{12}S)/2\pi d_{12}S$$

где $F_1(S)$ и $F_2(S)$ — структурные факторы, которые были бы измерены для каждого из двух белков в отдельности. *Указание:* примените для этой цели уравнение (13.27) и поместите центр одного из белков в начало координат.

14.2. На рис. 14.21 представлены гипотетические радиальные функции Паттерсона, рассчитанные по данным нейтроинного рассеяния для пар дейтерированных рибосомных белков. Используя эти функции и полагая, что белки являются либо вытянутыми эллипсоидами, либо сферами, постройте детальную картину частицы, где учитывалась бы форма отдельных белков и их взаимное расположение. Белков всего четыре. Цифрами возле каждой кривой обозначены соответствующие их пары. [Если встретятся затруднения, посмотрите работу Moore P. B., Engelman D. M., J. Mol. Biol., 112, 228 (1977).]

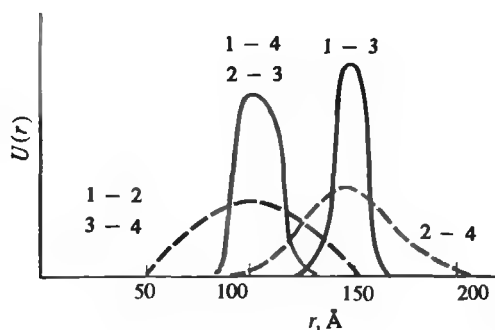


РИС. 14.21. Радиальные функции Паттерсона.

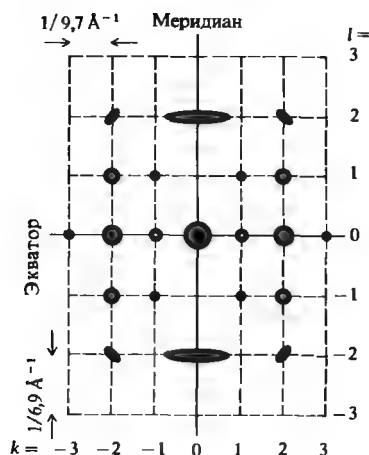


РИС. 14.22. Схематическая рентгенограмма волокна.

14.3. Используя методы, описанные в этой главе, рассчитайте малоугловое рентгеновское рассеяние для структуры, которая напоминает шар с радиусом R , разрезанный на бесконечно тонкие слои, отстоящие на расстояние h друг от друга; вещества между слоями нет. (Подобная структура показана на рис. 13.8, В.) *Указание:* воспользуйтесь теоремой свертки.

14.4. Попробуйте проинтерпретировать схематическую рентгенограмму фибрина шелка, показанную на рис. 14.22. Можете считать, что волокно полукристаллическое. (Если вы испытываете затруднения, обратитесь к рис. 13.27, А, Б.)

а. Почему нет меридионального рефлекса на первой слоевой линии? (Вспомните, что распределение интенсивности на меридиане определяется проекцией структуры на ось волокна.)

б. Почему дифракционное пятно на экваторе при $k = 2$ такое сильное? (Вспомните, что распределение интенсивности на экваторе определяется проекцией структуры на плоскость, перпендикулярную оси волокна.)

14.5. При измерении рассеяния света на крупных частицах белков или нуклеиновых кислот иногда серьезной помехой служат поглощение и флуоресценция.

а. Один способ — добавить в раствор сахарозу. Объясните, почему это помогает.

б. Другой способ (в случае флуоресценции) — использовать неполяризованный возбуждающий свет, но поместить перед детектором излучения горизонтальный поляризатор. Объясните, почему это помогает, и покажите, почему этот прием работает даже тогда, когда флуорофор жестко связан с частицей (так что моменты переходов при возбуждении и излучении параллельны).

в. При поглощении мы определяем ослабление первичного пучка в направлении его падения как $A = \lg I_0/I$. Кажущееся поглощение, обусловленное рассеянием, называется мутностью τ . Обычно она определяется как $\tau = \ln I_0/I$. Покажите, что мутность дается выражением $\tau \approx (16\pi/3)R_g$. *Указание:* прежде всего рассчитайте полное рассеяние, интегрируя по всем углам.

ЛИТЕРАТУРА

Общая

- Eisenberg H.*, 1971. Light scattering and some aspects of small angle x-ray scattering. In: *Procedures in Nucleic Acid Research* vol. 2, eds. G. L. Cantoni and D. R. Davies, New York, Harper and Row, p. 137.
- Fraser R. B. D., MacRae T. P.*, 1973. *Conformation of Fibrous Proteins and Related Synthetic Polypeptides*, New York, Academic Press.
- Guinier A.*, 1963. *X-Ray Diffraction in Crystals, Imperfect Crystals and Amorphous Bodies*, San Francisco, W. H. Freeman and Company.
- Holmes K. C., Blow D.*, 1960. *The Use of X-Ray Diffraction in the Study of Protein and Nucleic Acid Structure*, New York, Interscience.
- Schoenborn B. P.*, 1977. Neutron scattering and biological structures. *Chemical and Engineering News* (Jan. 24), p. 31.
- Tanford C.*, 1961. *Physical Chemistry of Macromolecules*, New York, Wiley. [Содержит очень полное рассмотрение рассеяния света.]

Специальная

- Berne B. J., Pecora R.*, 1976. *Dynamic Light Scattering*, New York, Wiley.
- Dickerson R. E.*, 1964. X-ray analysis and protein structure. In: *The Proteins*, 2nd ed., vol. 2, ed. H. Neurath, New York, Academic Press, p. 603.
- Engleman D. M., Moore P. B.*, 1975. Determination of quaternary structure by small angle neutron scattering, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **4**, 219.
- Erickson H. P., Klug A.*, 1971. Measurement and compensation of defocusing and aberration by Fourier processing of electron micrographs, *Phil. Trans. Roy. Soc. London Ser. B* **261**, 105.
- Frank J.*, 1973. Computer processing of electron micrographs. In: *Advanced Techniques in Biological Electron Microscopy*, ed. J. D. Kuehler, Berlin, Springer Verlag, p. 215.
- Henderson R., Unwin P. N. T.*, 1975. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy, *Nature*, **257**, 28.
- Pessen H., Kumonsinski T. F., Timasheff S. N.*, 1973. Small angle x-ray scattering. In: *Methods in Enzymology*, vol. 27, eds. C. H. W. Hirs and S. N. Timasheff, New York, Academic Press, p. 151.
- Pittz E. P., Lee J. C., Bablouzian B., Townend R., Timasheff S. N.*, 1973. Light scattering and differential refractometry. In: *Methods in Enzymology*, vol. 27, eds. C. H. W. Hirs and S. N. Timasheff, New York, Academic Press, p. 209.
- Schoenborn B. P., Nunes A. C.*, 1972. Neutron scattering, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **1**, 529.
- Shulman R. G., Eisenberger P., Kincaid B. M.*, 1978. X-ray absorption spectroscopy of biological molecules, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **7**, 559.
- Stuhrmann H. B.*, 1975. Small angle scattering of proteins in solution, *Brookhaven Symp. Biol.*, **27**, IV-3.
- Unwin P. N. T., Henderson R.*, 1975. Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens, *J. Mol. Biol.*, **94**, 425.

Приложение А

Основы матричной алгебры

Матрицей называется таблица, элементами которой являются числа или символы. Например,

$$\begin{pmatrix} 8 & 7 \\ 23 & 28 \end{pmatrix} \quad \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{pmatrix}$$

— это матрицы размером 2×2 (содержащие по две строки и по два столбца); символ a_{12} обозначает элемент, принадлежащий первой строке и второму столбцу. В общем случае a_{ij} представляет собой элемент i -й строки и j -го столбца. Для левой матрицы $a_{22} = 28$, $a_{21} = 23$ и т.д. В этой книге матрицы обозначаются буквами, выделенными жирным шрифтом со значком «тильда» под ними. Например, мы можем представить правую из приведенных выше матриц как $\underline{\mathbf{A}}$, где

$$\underline{\mathbf{A}} = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{pmatrix}$$

Матрица-строка (называемая также вектор-строкой) состоит только из одной строки:

$$\underline{\mathbf{A}}_r = (a_{11}, a_{12})$$

$\underline{\mathbf{A}}_r$ — это матрица размером 1×2 (с одной строкой и двумя столбцами). *Матрица-столбец* (или вектор-столбец) состоит только из одного столбца:

$$\underline{\mathbf{A}}_c = \begin{pmatrix} a_{11} \\ a_{21} \end{pmatrix}$$

$\underline{\mathbf{A}}_c$ — это матрица размером 2×1 (с двумя строками и одним столбцом). В общем случае матрица может быть любого размера — с n строками и m столбцами.

Перемножение матриц

Две матрицы могут быть перемножены, так что получится третья матрица:

$$\underline{\mathbf{a}}\underline{\mathbf{b}} = \underline{\mathbf{c}}$$

Элемент c_{ij} матрицы $\underline{\mathbf{c}}$ определяется как

$$c_{ij} = \sum_k a_{ik} b_{kj}$$

Таким образом, чтобы получить элементы c_i , нужно элементы i -й строки матрицы $\underline{\mathbf{a}}$ попарно перемножить с элементами j -го столбца матрицы $\underline{\mathbf{b}}$. Например, если

$$\underline{\mathbf{a}} = (a_{11}, a_{12}) \quad \text{и} \quad \underline{\mathbf{b}} = \begin{pmatrix} b_{11} & b_{12} \\ b_{21} & b_{22} \end{pmatrix}, \text{ то}$$

$$\begin{aligned} \underline{\mathbf{a}}\underline{\mathbf{b}} &= (a_{11}, a_{12}) \begin{pmatrix} b_{11} & b_{12} \\ b_{21} & b_{22} \end{pmatrix} \\ &= (a_{11}b_{11} + a_{12}b_{21}, a_{11}b_{12} + a_{12}b_{22}) \end{aligned}$$

Таким образом,

$$\underline{\mathbf{c}} = (c_{11}, c_{12}), \text{ где} \quad \begin{aligned} c_{11} &= a_{11}b_{11} + a_{12}b_{21} \\ c_{12} &= a_{11}b_{12} + a_{12}b_{22} \end{aligned}$$

Ясно, что перемножать матрицы можно только в том случае, когда число столбцов матрицы $\underline{\mathbf{a}}$ равно числу строк матрицы $\underline{\mathbf{b}}$. В общем случае матрицу $n \times m$ можно умножить только на матрицу $m \times p$, где n и p произвольны; получающаяся матрица имеет размер $n \times p$. В только что рассмотренном примере для матрицы $\underline{\mathbf{a}}$ $n = 1$, $m = 2$, а для матрицы $\underline{\mathbf{b}}$ $m = 2$, $p = 2$; умножение $\underline{\mathbf{a}}$ на $\underline{\mathbf{b}}$ дает матрицу $\underline{\mathbf{c}}$ размером $n \times p$, или 1×2 (матрица-строка).

Рассмотрим еще один пример. Пусть

$$\begin{aligned} \underline{\mathbf{a}} &= \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{pmatrix} \\ \underline{\mathbf{b}} &= \begin{pmatrix} b_{11} & b_{12} \\ b_{21} & b_{22} \end{pmatrix} \\ \underline{\mathbf{c}} &= \underline{\mathbf{a}}\underline{\mathbf{b}} \\ &= \begin{pmatrix} a_{11}b_{11} + a_{12}b_{21} & a_{11}b_{12} + a_{12}b_{22} \\ a_{21}b_{11} + a_{22}b_{21} & a_{21}b_{12} + a_{22}b_{22} \end{pmatrix} \end{aligned}$$

Таким образом, если матрицу 2×2 умножить на матрицу 2×2 , произведение также будет матрицей 2×2 .

Если матрицу 1×2 умножить на матрицу 2×1 , получится матрица 1×1 , которая является просто числом (скаляром) и не рассматривается более как матрица. Например,

$$\begin{aligned} \underline{\mathbf{a}} &= (a_{11}, a_{12}) \\ \underline{\mathbf{b}} &= \begin{pmatrix} b_{11} \\ b_{21} \end{pmatrix} \\ \underline{\mathbf{a}}\underline{\mathbf{b}} &= a_{11}b_{11} + a_{12}b_{21} \end{aligned}$$

Если матрица является квадратной (число строк равно числу столбцов), она может быть возведена в любую степень. Например, для квадратной матрицы $\underline{\mathbf{M}}$

$$\underline{\mathbf{M}}^3 = \underline{\mathbf{M}}\underline{\mathbf{M}}\underline{\mathbf{M}}$$

$$\underline{\mathbf{M}}^N = \prod_{i=1}^N \underline{\mathbf{M}}$$

(последняя запись означает, что $\underline{\mathbf{M}}$ умножается на себя N раз). Эта операция возможна только с квадратной матрицей, потому что только в этом случае выполняется условие, необходимое для перемножения матриц. Отметим также, что если $\underline{\mathbf{M}}$ имеет размер $n \times n$, то и $\underline{\mathbf{M}}^N$ должна иметь размер $n \times n$.

Нахождение матрицы, обратной данной

Для квадратной матрицы $\underline{\mathbf{a}}$ можно найти обратную матрицу $\underline{\mathbf{a}}^{-1}$, такую, что

$$\underline{\mathbf{a}}^{-1}\underline{\mathbf{a}} = \underline{\mathbf{I}}$$

где $I_{ij} = 0$ для $i \neq j$, $I_{ij} = 1$ для $i = j$. Матрица $\underline{\mathbf{I}}$ называется *единичной*. Например, если $\underline{\mathbf{I}}$ — матрица 2×2 , то

$$\underline{\mathbf{I}} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix}$$

Отметим, что $\underline{\mathbf{I}}$ обладает тем свойством, что любая матрица, умноженная на нее, остается неизменной. Таким образом, $\underline{\mathbf{I}}$ аналогична числу 1 в скалярной алгебре, так что $\underline{\mathbf{a}}\underline{\mathbf{I}} = \underline{\mathbf{a}}$. Найти $\underline{\mathbf{a}}^{-1}$ сравнительно просто. Пусть, например,

$$\underline{\mathbf{a}} = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{pmatrix}$$

Тогда $\underline{\mathbf{a}}^{-1}$ находится следующим образом:

$$\underline{\mathbf{a}}^{-1} = \begin{pmatrix} a_{22}/\alpha & -a_{12}/\alpha \\ -a_{21}/\alpha & a_{11}/\alpha \end{pmatrix}, \text{ где } \alpha = a_{11}a_{22} - a_{21}a_{12}$$

т.е. α является детерминантом матрицы $\underline{\mathbf{a}}$. (Ясно, что для существования $\underline{\mathbf{a}}^{-1}$ детерминант не должен быть равен нулю.)

Приведение матрицы к диагональному виду

Для матрицы 2×2 существует матрица $\underline{\mathbf{T}}$, такая, что

$$\underline{\mathbf{T}}^{-1}\underline{\mathbf{a}}\underline{\mathbf{T}} = \begin{pmatrix} \lambda_1 & 0 \\ 0 & \lambda_2 \end{pmatrix}$$

где λ_1 и λ_2 — собственные числа матрицы $\underline{\mathbf{a}}$, а $\underline{\mathbf{T}}$ называется преобразующей матрицей. Вычислить собственные числа не составляет труда. Пусть

$$\underline{\mathbf{a}} = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{pmatrix}$$

Чтобы найти λ_1 и λ_2 , нужно решить уравнение

$$\begin{aligned} 0 &= \begin{vmatrix} a_{11} - \lambda & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} - \lambda \end{vmatrix} \\ &= (a_{11} - \lambda)(a_{22} - \lambda) - a_{12}a_{21} \\ &= \lambda^2 - (a_{11} + a_{22})\lambda + a_{11}a_{22} - a_{12}a_{21} \end{aligned}$$

Используя формулу для нахождения корней квадратного уравнения, получаем

$$\lambda = \{(a_{11} + a_{22}) \pm [(a_{11} + a_{22})^2 - 4(a_{11}a_{22} - a_{12}a_{21})]^{1/2}\}/2$$

Пусть λ_1 соответствует знаку «+» в формуле, а λ_2 — знаку «-», т.е. $\lambda_1 > \lambda_2$. Найдем матрицу $\underline{T}$. Если

$$\underline{a} = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{pmatrix}, \text{ то}$$

$$\underline{T} = \begin{pmatrix} (\lambda_1 - a_{22})/a_{21} & (\lambda_2 - a_{22})/a_{21} \\ 1 & 1 \end{pmatrix}$$

$$\underline{T}^{-1} = \begin{pmatrix} a_{21}/(\lambda_1 - \lambda_2) & (a_{22} - \lambda_2)/(\lambda_1 - \lambda_2) \\ -a_{21}/(\lambda_1 - \lambda_2) & (\lambda_1 - a_{22})/(\lambda_1 - \lambda_2) \end{pmatrix}.$$

где λ_1 и λ_2 — собственные числа матрицы $\underline{a}$.

Укажем два других полезных свойства матрицы $\underline{a}$ размером 2×2 :

$$\lambda_1 + \lambda_2 = a_{11} + a_{22}$$

$$\lambda_1 \lambda_2 = a_{11}a_{22} - a_{12}a_{21}$$

Эти соотношения вместе с только что приведенными выражениями для $\underline{T}$ и $\underline{T}^{-1}$ достаточно, чтобы получить выражения для преобразующей матрицы в уравнении (20.53) и обратной ей в уравнении (20.54). Нетрудно также обобщить эти результаты на случай матриц $n \times n$, где $n > 2$.

Полезное введение в матричную алгебру можно найти в гл. 1 книги «Методы прикладной математики» Ф. Б. Хильдебранда [F. B. Hildebrand, Methods of Applied Mathematics (Englewood Cliffs, N. J.: Prentice-Hall, 1965)].

Решение задач

ГЛАВА 7

7.1. Стратегия решения этой задачи состоит в том, чтобы выразить матричные элементы, относящиеся к тримеру, через соответствующие величины для мономера (типа $\langle \phi_{1a} | \phi_{1a} \rangle = 0$). Например, интеграл $\langle \phi_{10} \phi_{2a} \phi_{30} | \mathbf{V}_{12} | \phi_{10} \phi_{20} \phi_{3a} \rangle$ равен нулю вследствие ортогональности функций ϕ_{30} и ϕ_{3a} . Интеграл $\langle \phi_{10} \phi_{20} \phi_{30} | \mu_{11} | \phi_{10} \phi_{20} \phi_{30} \rangle$ равен нулю из-за того, что постоянный дипольный момент мономера для простоты полагаем равным нулю.

а. Запишите в явном виде интегралы типа

$$\langle \Psi_{A^0} | \Psi_{A^0} \rangle = 1$$

$$\langle \Psi_{A^0} | \Psi_{A^+} \rangle = 0$$

и покажите, что они равны 1 и 0 соответственно.

б. Запишите в явном виде интегралы типа

$$\langle \Psi_{A^-} | \mathbf{H} | \Psi_{A^-} \rangle$$

Покажите справедливость следующих соотношений:

Состояние	Энергия
0	$3E_0$
A^0	$2E_0 + E_a$
A^+	$2E_0 + E_a + \sqrt{2}V$
A^-	$2E_0 + E_a - \sqrt{2}V$

E_0 и E_a — соответственно энергии мономера в состояниях 0 и a .

в. Здесь решение непосредственно вытекает из б.

г. Покажите, что интегралы вида $\langle \Psi_{A^+} | \mathbf{H} | \Psi_{A^-} \rangle$ равны нулю.

д. Вычислите интегралы вида $|\langle \Psi_0 | \mu_1 + \mu_2 + \mu_3 | \Psi_{A^+} \rangle|^2 = D_{0A^+}$.

е. $D_{0A^0} + D_{0A^+} + D_{0A^-} = 3D_{0a}$.

ж. Покажите, что интегралы вида $\langle \Psi_{A^+} | \mathbf{H} | \Psi_{A^0} \rangle$ отличны от нуля.

7.2. Сила диполя, а следовательно, поглощение пропорциональны величине $(\mu_D \cdot E)^2$, где μ_D — момент перехода для димера, равный $\mu_{D\pm} = \langle 0 | \mu_1 | a \rangle \pm \langle 0 | \mu_2 | a \rangle$, а E — вектор электрического поля световой волны. Вычислите отдельно поглощение для параллельной и перпендикулярной поляризации. Затем, используя выражение (7.42), вычислите дихроичное отношение. Результаты для переходов $0A^+$ и $0A^-$ должны соответственно составить $+0,5$ и $-0,5$.

7.3. Разумно считать, что агрегат является совершенно непрозрачным образованием. Тогда остается только определить, какая часть поперечного сечения кюветы приходится на агрегаты. Она составляет $3,3 \cdot 10^{-4}$. Дальнейшие указания к решению этой задачи можно найти в Дополнении 7.2.

7.4. Хотя при определении гипохроизма обычно используют понятие силы осциллятора, мы не совершим ошибки, если выразим эту величину через силу диполя. Теория, приведенная в Дополнении 7.3, дает следующие соотношения между силами диполей для димера и мономера, приходящимися на остаток: $D_{0A} = D_{0a} - C/R^3$, где C — постоянная. Для данной задачи мы можем определить величину C/R^3 , написав

$$h = (2D_{0a} - 2D_{0A})/2D_{0a} = 0,1$$

Чтобы найти гипохроизм тетрамера, нужно учесть три взаимодействия между ближайшими соседями, находящимися друг от друга на расстоянии R , два более дальних взаимодействия между мономерами, разделенными расстоянием $2R$, и одно взаимодействие на расстоянии $3R$. Тогда гипохроизм тетрамера можно записать в виде

$$h = \frac{4D_{0a} - 4D_{0a} + 3C/R^3 + 2C/(2R)^3 + C/(3R)^3}{4D_{0a}}$$

откуда $h = 16,4\%$.

7.5. Выразите энергию перехода с $\lambda = 280$ нм в ккал · моль⁻¹. Теперь легко сделать остальное. Ответ: 294 нм.

ГЛАВА 8

8.1. Эту задачу можно решить несколькими способами. Пожалуй, наиболее простой из них состоит в том, чтобы из имеющихся данных выразить время жизни донора τ_D и скорость переноса энергии между донором и одним акцептором k_T через скорость флуоресценции донора k_F . Поскольку скорость переноса возбуждения от донора к обоим акцепторам одинакова, мы получим, что в случае двух акцепторов

$$\phi_D = k_F/(2k_T + 1/\tau_D) = 0,167$$

8.2. Нелинейность графика Перрена в области ~ 300 К, вероятно, обусловлена тепловыми конформационными изменениями. В предельном случае высоких температур эффективный объем гидратированной белковой молекулы становится больше (наклон уменьшается), а флуоресцентная метка может приобрести большую свободу вращения (завышенное экстраполяционное значение $1/A$).

8.3. См. решение этой задачи в работе Warshaw M. M., Cantor C. R., Biopolymers, 9, 1079 (1970).

8.4. Необходимо рассмотреть как член, отвечающий магнитно-электрическому взаимодействию, так и экситонный член, а также расщепление полос. Только когда один из этих членов и расщепление одновременно не равны нулю, оптическая активность димера будет отличаться от наблюдаемой для мономера.

Случай	Магнитно-электрическое взаимодействие	Экситонное взаимодействие	V_{12}	КД
а	0	0	$\neq 0$	Мономер
б	$\neq 0$	0	$\neq 0$	Димер
в	0	$\neq 0$	0	Мономер
г	0	$\neq 0$	$\neq 0$	Димер
д	0	0	$\neq 0$	Мономер
е	$\neq 0$	$\neq 0$	0	«
ж	$\neq 0$	$\neq 0$	$\neq 0$	Димер

8.5. Поскольку остатки, расположенные на поверхности белковой молекулы, в водном растворе оказываются в значительной мере связанными с молекулами воды при помощи водородных связей, добавление растворителя, не способного к образованию таких связей, должно вызвать возмущения, приводящие к спектральным изменениям. Разумеется, белок при этом может денатурировать. Возмущение при помощи изотопного растворителя, т.е. D_2O , в этом смысле является более безопасным. Однако даже при участии внутренних протонов происходит довольно быстрый водородный обмен, что затрудняет применение такого подхода.

Полосы с большими частотами могут отвечать переходам в пептидных группах, находящихся внутри белковой молекулы и не образующих водородных связей, хотя энергетически это маловероятно.

ГЛАВА 9

9.1. Векторное произведение $\mathbf{M} \times \gamma \mathbf{H}$ легко получить из определителя

$$\begin{aligned} \mathbf{M} \times \gamma \mathbf{H} &= \begin{vmatrix} \hat{i} & \hat{j} & \hat{k} \\ M_x & M_y & M_z \\ \gamma H_x & \gamma H_y & \gamma H_z \end{vmatrix} \\ &= \gamma(\hat{i}(M_y H_z - M_z H_y) - \hat{j}(M_x H_z - M_z H_x) \\ &\quad + \hat{k}(M_x H_y - M_y H_x)) \end{aligned}$$

Добавление к этому выражению релаксационных членов [вторая строчка в уравнении (9.22)] дает

$$\begin{aligned} dM_x/dt &= \gamma M_y H_z - \gamma M_z H_y - (M_x/T_2) \\ dM_y/dt &= -\gamma M_x H_z + \gamma M_z H_x - (M_y/T_2) \\ dM_z/dt &= \gamma M_x H_y - \gamma M_y H_x - (M_z - \bar{M}_z)/T_1 \end{aligned}$$

Подстановка $H_x = H_{xy} \cos \omega t$ и $H_y = -H_{xy} \sin \omega t$ приводит к уравнению (9.25).

9.2. Приравняем правые части уравнений (9.27а, б, в) нулю. Это даст систему линейных уравнений относительно u , v и M_z . Из уравнения (9.27а) получим

$$u = -T_2(\omega_0 - \omega)g$$

Подставляя это выражение в уравнение (9.27б), найдем v

$$v = -\gamma T_2 H_{xy} M_z / (1 + T_2^2 [\omega_0 - \omega]^2)$$

Это выражение вместе с уравнением (9.27в) позволяет найти M_z [уравнение (9.29а)]. После этого легко получить и уравнения (9.29б) и (9.29в) путем подстановки уравнения (9.29а) в приведенные здесь выражения.

9.3. Из условия задачи следует, что при добавлении X белок переходит в неупорядоченную форму, в которой С-2-протоны всех гистидинов становятся неразличимыми по своим магнитным свойствам. Однако, прежде чем произойдет полная денатурация, белок должен побывать по крайней мере в одном состоянии, которое сосуществует с нативной формой. Это — упорядоченное состояние, поскольку сигналы, отвечающие четырем С-2-протонам, занимают вполне определенные положения в спектре, а это означает, что магнитное окружение протонов неодинаково. Более того, одновременное присутствие промежуточной и нативной форм свидетельствует о том, что обе эти формы являются относительно долгоживущими, в противном случае обмен между ними приводил бы к регистрации лишь одной линии от каждого гистидина, а не двух. Если резонансная частота данного С-2-протона в нативной форме равна ω , а в промежуточной форме — ω' , то время жизни в каждом из состояний $\tau \gg |\omega - \omega'|^{-1}$.

9.4. Протонам ароматических колец обычно отвечают сигналы, расположенные в гораздо более низкочастотной области, чем $-80 \div -160$ Гц, где должен наблюдаться резонанс метиленовых и метильных групп (разд. 9.6). Таким образом, добавление аффинной метки затрагивает остаток (тирозин), который вряд ли дает сигнал в спектральной области от -80 до -160 Гц, где наблюдаются изменения при присоединении лиганда. (Правда, ситуация изменится, если модифицируется не ароматическое кольцо тирозина, а его β -метиленовая группа, протоны которой могут давать сигналы в этой области. Существует опасность, что L' связывается с другим участком, а не с L , поэтому имеет смысл снять спектр аффинно меченого белка. Если в области от -80 до -160 Гц при присоединении аффинной метки никаких изменений в спектре не происходит, то, скорее всего, L' не находится в центре связывания L . Если же, напротив, спектр меченого белка в этой области изменяется так же, как это происходит при связывании немодифицированного белка с L , то весьма вероятно, что L' присоединяется в области активного центра, а его действие на молекулу белка сравнимо с действием L , даже если протоны тирозина не затрагиваются.

9.5. В случае трех эквивалентных протонов квантовые числа суммарного ядерного спина равны $-3/2, -1/2, 1/2, 3/2$. Следовательно, имеются четыре перехода ЭПР (по одному на каждое значение суммарного ядерного спина) и четыре линии ЭПР. Нижний по энергии электронный спиновый переход отвечает ядерному спину $-3/2$, а переход с наибольшей энергией — ядерному спину $3/2$ (см. рис. 9.27). Для n эквивалентных ядер, каждое из которых обладает спином I , суммарный спин будет изменяться от $-nI$ до nI . Переходы от $-nI$ к nI включительно с шагом «единица», мы получим $2nI + 1$ состояний, которые отвечают $2nI + 1$ допустимым значениям суммарного ядерного спина. Это приведет к $2nI + 1$ линиям в спектре ЭПР для электрона, взаимодействующего с n эквивалентными ядрами со спином I .

ГЛАВА 10

10.1. При наличии лишь двух субъединиц уравнение (10.34) принимает следующий простой вид: $f_d/f_m = 2(1 + 1/2\alpha_{12})^{-1}$. В случае, когда эти субъединицы соприкасаются, $\alpha_{12} = 2$; если же они находятся на значительном расстоянии друг от друга, то α_{12} становится бесконечно большой величиной.

10.2. Вычислим $V_{\text{гидр}}$ с помощью уравнения (10.11), а затем по формуле (10.18) найдем $f_{\text{вр}}$. Далее воспользуемся рис. 10.11, B и найдем F_a и F_b для случая вытянутого эллипсоида с отношением осей 8:1, после чего нетрудно вычислить f_a и f_b . Наконец, подставив эти последние значения в уравнения (10.23а) и (10.23б), получим $\tau_a = 1220$ нс и $\tau_b = 161$ нс.

10.3. Согласно табл. 10.3, отношение $f/f_{\text{мин}}$ для тропомиозина составляет 3,22. Воспользовавшись табличным значением парциального удельного объема и заданным в условии задачи значением коэффициента гидратации, найдем, чему равно стоящее в скобках выражение из уравнения (10.70). Затем вычислим коэффициент Перрена F , который оказывается равным 2,86. Согласно табл. 10.2, в случае сплюсненного эллипсоида отношение осей при этом равно 90. Объем гидратированной формы белка вычисляем с помощью уравнения (10.11), воспользовавшись значением молекулярной массы тропомиозина, приведенным в табл. 10.3. Для сплюсненного эллипсоида тот же объем находится по формуле $(4/3)\pi a^2 b$. Согласно найденной величине отношения осей, $a = 90b$; отсюда уже нетрудно найти b . После соответствующих вычислений получаем для малой полуоси величину 1,66 Å. Эта величина слишком мала и не может соответствовать реальной пептидной цепи, поэтому тропомиозин должен иметь вытянутую форму.

10.4. Следует воспользоваться уравнениями (10.36) и (10.46). В результате получим $2,08 \cdot 10^{-5} \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$.

10.5. Наибольший возможный коэффициент диффузии имеет сферическая молекула в отсутствие гидратации. Воспользовавшись уравнениями (10.66), (10.68) и (10.69), получим $13,2 \cdot 10^7 \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$. При гидратации $\sim 0,40$ г/г эту величину следует разделить на 1,16. Если предположить, что молекула имеет максимально вытянутую форму при наибольшей в пределах допустимого величине отношения

осей, равной 100, то коэффициент диффузии уменьшается еще в 4 раза (согласно табл. 10.2). Так что окончательно получаем величину $\sim 2,8 \cdot 10^7 \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$.

ГЛАВА 11

11.1. Плотность меди равна $8,96 \text{ г/см}^3$. Используя это значение, находим, что радиус медного шарика составляет $0,299 \text{ см}$. С помощью уравнения (11.28) вычислим его коэффициент седиментации: $15,8 \text{ с}$. Скорость в центрифуге найдем, воспользовавшись уравнением (11.3) (не забудьте перевести угловую скорость в рад/с). Она равна $1,58 \text{ см/с}$. Коэффициент седиментации — это скорость в установившемся режиме в единичном поле. Им можно воспользоваться для вычисления скорости свободного погружения медного шарика в водоем, вспомнив, что ускоряющее поле в этом случае составляет 980 см/с^2 (ускорение за счет силы тяжести у поверхности Земли). Эта скорость оказывается равной $15\,500 \text{ см/с}$. Простая мораль такова: не стой под падающими медными шариками. Оговоримся, впрочем, что задолго до того, как шарик наберет такую скорость в воде, возникнет турбулентность.

11.2. Вычислим полную массу ($M_{\text{полн}}$), перенесенную за время опыта через поверхность с координатой $x_{\text{п}}$. Поскольку $x_{\text{п}}$ принадлежит области плато, диффузией можно пренебречь, и, следовательно, концентрация в любой момент времени определяется уравнением (11.17). Перенос массы выражается равенством:

$$M_{\text{полн}} = \int_0^t a \phi x_{\text{п}}^2 \omega^2 s c(t) dt$$

Подставив вместо $c(t)$ выражение (11.17), получим

$$M_{\text{полн}} = a \phi \omega^2 x_{\text{п}}^2 s c_0 (1 - e^{-2\omega^2 s t}) / 2$$

Можно получить $M_{\text{полн}}$ другим путем, вычислив полную массу до и после центрифугирования в той части ячейки, которая расположена выше $x_{\text{п}}$. Изменение полной массы равно

$$M_{\text{полн}} = (c_0 - c_{\text{в}}) \phi a (x_{\text{п}}^2 - x_{\text{м}}^2) / 2$$

Эти два выражения для $M_{\text{полн}}$ должны быть равны друг другу. Из получившегося уравнения находим коэффициент седиментации

$$s = \left(-\frac{1}{2} \omega^2 t \right) \ln [x_{\text{м}}^2 / x_{\text{п}}^2 - (c_{\text{в}} / c_0) (1 - x_{\text{м}}^2 / x_{\text{п}}^2)]$$

11.3. Пусть индекс «н» относится к нативному белку, а индекс «ПХМБ» — к препарату, обработанному ПХМБ.

а. Для отношения молекулярных масс получим:

$$M_{\text{н}} / M_{\text{ПХМБ}} = (s_{\text{н}} / s_{\text{ПХМБ}}) (D_{\text{ПХМБ}} / D_{\text{н}}) = 3,98$$

Таким образом, фермент состоит из четырех субъединиц.

б. Воспользовавшись уравнением (11.36), куда входит фактор формы Перрена, можно написать для отношения коэффициентов седиментации:

$$s_{\text{н}} / s_{\text{ПХМБ}} = (M_{\text{н}} / M_{\text{ПХМБ}})^{2/3} (F_{\text{ПХМБ}} / F_{\text{н}})$$

Пользуясь данными табл. 10.2, по известной величине отношения осей, равной 20, можно оценить $F_{\text{н}}$, который оказывается равным 2,0. Отсюда $F_{\text{ПХМБ}} = 1,25$. К этому же значению $F_{\text{ПХМБ}}$ можно прийти, воспользовавшись данными по диффузии.

в. Самой простой моделью для белка, обработанного ПХМБ, служит вытянутый эллипсоид с отношением осей 5:1. Стрэйтаза, очевидно, названа так не зря¹⁾: она состоит из четырех выстроенных в ряд субъединиц.

11.4. После того как мы удалили центральную часть, фрикционные свойства сферы не изменились,

¹⁾ Название гипотетического фермента имеет в основе английское слово *straight* (произносится *стрэйт*), что означает «прямой». — Прим. перев.

но масса безводной формы уменьшилась на одну восьмую. Отсюда находим коэффициент седиментации, который оказывается равным 7S.

11.5. Воспользуемся уравнением (11.48), учитывая при этом тот факт, что, хотя молярный объем дейтерированного белка и не изменился, парциальный удельный объем белка должен уменьшиться во столько же раз, во сколько увеличилась его молекулярная масса, т.е. в 1,0155 раза. Парциальный удельный объем белка равен

$$\bar{V}_2 = \frac{1,0155 - S_D/S_H}{\rho_D - \rho_H(S_D/S_H)}$$

где S_D и S_H — наклоны прямых на графиках зависимости $\ln c_2$ от x^2 , построенных в соответствии с уравнением (11.48), а ρ_D и ρ_H — плотность раствора соответственно в D_2O и в H_2O .

ГЛАВА 12

12.1. Обозначим через V_s объем верхнего слоя плюс свободный объем, а через V_i — объем внутренних областей геля. Концентрация белка в верхнем слое составит N_B/V_s . Концентрация лиганда в системе, не содержащей белка, будет равна $N_L/(V_s + V_i)$. С помощью этих двух систем мы сможем определить V_s и V_i . Концентрация лиганда в верхнем слое сосуда, содержащего как лиганд, так и белок, равна $\nu N_B[1/V_s - 1/(V_s + V_i)] + N_L/(V_s + V_i)$, где ν — среднее число связанных лигандов, приходящихся на одну белковую молекулу. С помощью этой системы можно определить ν .

12.2. Согласно табл. 10.2, коэффициент Симхи для вытянутого эллипсоида с отношением осей 18:1 равен 33. Если значение парциального удельного объема принять равным $0,73 \text{ см}^3/\text{г}$, то, пользуясь формулой (12.22), мы получим для степени гидратации величину $0,39 \text{ г/г}$. Это вполне разумная величина.

12.3. Задача сводится к тому, чтобы вывести аналог уравнения Шераги — Манделькерна, скомбинировав выражения для вязкости и диффузии. Извлечем корень кубический из обеих частей равенства (12.52), поделим на это равенство уравнение (12.53) и подставим kT/D вместо f . Далее полученное равенство, соответствующее одной форме белка, поделим на аналогичное равенство для другой формы. Пусть индексы 1 и 2 относятся соответственно к мономеру и димеру, тогда

$$\frac{D_1[\eta_1]^{1/3}}{D_2[\eta_2]^{1/3}} = \frac{\nu_1^{1/3} M_2^{1/3} F_2}{\nu_2^{1/3} M_1^{1/3} F_1} = \frac{M_2^{1/3} \beta_1}{M_1^{1/3} \beta_2}$$

Мы воспользовались здесь уравнением (12.29), чтобы заменить отношения коэффициентов Симхи и Перрена на отношение параметров Шераги — Манделькерна. Так как мономер имеет сплюснутую форму, то для него наиболее вероятное значение параметра Шераги — Манделькерна составляет 2,12. На основе этого значения и исходных данных получим для β_2 значение 2,54, что соответствует случаю вытянутого эллипсоида с отношением осей, равным 16. Очевидно, что исходные данные в этой задаче весьма условны.

12.4. Следует проводить оценку по формуле (12.44), подставив туда значение вращательного времени релаксации, вычисленное по формуле (12.43). Приняв для степени гидратации величину $0,3 \text{ г/г}$ и воспользовавшись приведенными в табл. 12.1 данными по вязкости, получим тип вытянутого эллипсоида с отношением осей, равным 55. Пользуясь тем, что известна величина молекулярной массы, вычислим молярный объем миозина. Поскольку объем вытянутого эллипсоида рассчитывается по формуле $4\pi ab^2/3$, то, зная величину отношения осей, можно оценить величину большой полуоси. Окончательно получаем для χ величину $0,749 \text{ рад}$, или $42,9^\circ$. (Заметим, что если не учитывать гидратацию, то отношение осей равно 68, а угол χ оказывается равным $0,729 \text{ рад}$, или $41,8^\circ$.)

12.5. Молекула белка, масса которой составляет 15 000 дальтон, содержит ~ 150 аминокислот. Если большая часть молекулы представляет собой α -спираль, что благодаря присутствию ДСН кажется

вполне вероятным, то, считая по $1,5 \text{ \AA}$ на аминокислотный остаток, ее длина составит $225 \text{ \AA}$. Исходя из приводимого в основном тексте значения диаметра комплексов ДСН — белок, равного $18 \text{ \AA}$, можно заключить, что отношение осей приблизительно равно 12. При такой или меньшей величине отношения осей становится неверным используемое в основном тексте приближение, согласно которому величина коэффициента трения молекулы прямо пропорциональна ее длине.

ГЛАВА 13

13.1. Для цепочки из шести атомов, изображенной на рисунке, результат можно коротко записать в следующем виде:

$$f(S)2[\cos(\pi a \cdot S) + \cos(3\pi a \cdot S) + \cos(5\pi a \cdot S)]$$

где $f(S)$ — рассеивающий фактор атома.

Результат для бесконечной одномерной решетки легко получить с помощью сверток. В этом случае

$$F_{\text{сумм}}(S) = f(S)e^{\pi i a \cdot S} \sum_{n=-\infty}^{\infty} e^{2\pi i n a \cdot S}$$

что в точности эквивалентно уравнению (13.31), поскольку с учетом ограничений, налагаемых условиями Лауэ, экспоненциальный множитель перед суммой должен быть равен $+1$ или -1 . Таким образом, он не может давать вклада в наблюдаемые интенсивности. Эта задача иллюстрирует тот факт, что наблюдаемое рассеяние не зависит от выбора начала координат элементарной ячейки.

13.2. Обратная решетка представляет собой следующее множество точек:

$$\begin{array}{ccccccc} & & 1/R & & 1/R & & 1/R & & 1/R & & \mathbf{a}^* \longrightarrow \\ 1/4R & \cdot & & \cdot & & \cdot & & \cdot & & \cdot & \\ 1/4R & \cdot & & \cdot & & \cdot & & \cdot & & \cdot & \\ 1/4R & \cdot & & \cdot & & \cdot & & \cdot & & \cdot & \\ & & & & & & & & & & \\ \mathbf{b}^* \downarrow & & & & & & & & & & \end{array}$$

Молекулярный структурный фактор равен

$$F_m(S) = f(S)[1 + 2e^{\pi i k/2} + e^{\pi i k}]e^{2\pi i h}$$

Распределение интенсивности рассеяния имеет вид

$$I(S) = f^2(S)[6 + 8 \cos(\pi k/2) + 2 \cos(\pi k)]$$

Легко видеть, что интенсивность не зависит от h . Оценки ее для различных k дают

$$\begin{array}{ll} k = 0, 4, 8, \dots & I = 16f^2(S) \\ k = 1, 3, 5, 7, 9, \dots & I = 4f^2(S) \\ k = 2, 6, 10, \dots & I = 0 \end{array}$$

13.3. Опустите перпендикуляр на F_{PH} из конца вектора F_{P} . Этот перпендикуляр разделит F_{PH} на два отрезка неравной длины; длины получившихся отрезков можно выразить через длины векторов F_{P} и F_{H} , воспользовавшись простыми геометрическими соображениями. Их суммарная длина есть $|F_{\text{PH}}|$.

$$|F_{\text{PH}}| = |F_{\text{P}}| \cos(\phi_{\text{PH}} - \phi_{\text{P}}) + |F_{\text{H}}| \cos(\phi_{\text{H}} - \phi_{\text{PH}})$$

Последнее выражение преобразуется к окончательному результату, приведенному в задаче, если учесть равенство $\cos A = 1 - 2\sin^2(A/2)$. Амплитуда рассеяния от тяжелого атома будет оцени-

ваться наилучшим образом при очень близких фазах тяжелого атома и тяжелоатомного изоморфно-го производного.

13.4. Молекула состоит из пяти эквивалентных атомов, расположенных следующим образом:



13.5. Это непростая задача, но она дает возможность получить хорошее представление о приемах, используемых в кристаллографии.

а. Перейдите от интенсивностей к амплитудам, а затем оцените электронную плотность тяжелого атома, используя одномерный аналог уравнения (13.93).

$$\rho_H(x) = \sum_{h=0}^3 \|F_{PH}(h)\| - \|F_P(h)\| e^{i\phi(h)} e^{2\pi i h x}$$

Предположите, что каждый фазовый множитель $e^{i\phi(h)}$ равен 1. В результате получатся максимумы электронной плотности: $10 + 2\sqrt{5}$ (при $x = 0$) и $10 - 2\sqrt{5}$ (при $x = 1/2$).

б. Тяжелый атом находится в точке $x = 0$, фазовые множители равны 1 для всех h . Таким образом, это случай, уже оцененный в п. а. Если же тяжелый атом находится в точке $x = 1/2$, то фазовые множители равны

$$+1, -1, +1, -1 \text{ для } h = 0, 1, 2, 3$$

Это опять приводит к двум максимумам электронной плотности: $10 - 2\sqrt{5}$ (при $x = 0$) и $10 + 2\sqrt{5}$ (при $x = 1/2$). Таким образом, четкого различия между двумя случаями нельзя получить.

в. Чтобы рассчитать фазы каждого $F_P(h)$ для двух возможных положений тяжелого атома, полученных в п. а и б, воспользуйтесь методом, проиллюстрированным на рис. 13.37, А. Результат будет следующий:

h	0	1	2	3
$x = 0$	+1	$-\sqrt{5}/5 \pm 2\sqrt{5}/5(i)$	-1	$-\sqrt{5}/5 \pm 2\sqrt{5}/5(i)$
$x = 1/2$	+1	$+\sqrt{5}/5 \pm 2\sqrt{5}/5(i)$	-1	$+\sqrt{5}/5 \pm 2\sqrt{5}/5(i)$

где в принципе каждый «+» и «-» отвечает независимым возможным выбором фазы. Практически, если для $h = 1$ выбирается «+», то для $h = 3$ необходимо выбрать «-», и наоборот; это делается для того, чтобы рассчитанные электронные плотности оказались вещественными. При таком подходе остаются четыре возможных набора фаз. Для каждого из них с помощью измеренных $|F_P|$ и вычисленных фаз рассчитайте [уравнение (13.93)] электронную плотность для $x = 0, 1/4, 1/2$ и $3/4$ длины элементарной ячейки, суммируя члены с $h = 0, 1, 2, 3$. Поделите все результаты на 4, чтобы ввести поправку на различие в объемах используемых ячеек. Должны получиться следующие результаты:

Вариант	$x = 0$	1/4	1/2	3/4
Тяжелый атом в точке $x = 0$; для $h = 1$ выбран «+»	0	2	1	4
Тяжелый атом в точке $x = 0$; для $h = 1$ выбран «-»	0	4	1	2
Тяжелый атом в точке $x = 1/2$; для $h = 1$ выбран «+»	1	2	0	4
Тяжелый атом в точке $x = 1/2$; для $h = 1$ выбран «-»	1	4	0	2

Все структуры одинаковы и различаются только выбором начала отсчета и положительного направления. Обратите внимание, что положение, где будет располагаться тяжелый атом у тяжелоатомного изоморфного производного, у исходного кристалла является незанятым.

ГЛАВА 14

14.1. Для того чтобы рассчитать интенсивность рассеяния от молекулы (объекта) при выбранной ее ориентации, по уравнению (13.27) вычисляют структурный фактор, а затем находят произведение FF^* . В результате получают

$$I(S) = |F_1(S)|^2 + |F_2(S)|^2 + F_1^*(S)F_2(S)e^{2\pi i S \cdot d_{12}} + F_1(S)F_2^*(S)e^{-2\pi i S \cdot d_{12}}$$

Поскольку интенсивность — величина наблюдаемая, она должна быть вещественной. Поэтому каждый из входящих в нее членов должен либо быть вещественным, либо иметь мнимую часть, взаимно уничтожающуюся с мнимой частью других членов. Это позволяет ввести в рассмотрение комплексно-сопряженное четвертого слагаемого, которое идентично третьему слагаемому. Следующим шагом должно быть сферическое усреднение каждого из оставшихся в сумме членов, выполняемое при помощи уравнений (13.20) и (13.21). Поскольку мнимые части комплексных величин при таком усреднении исчезнут, получится результат, данный в формулировке задачи.

14.2. Четыре белка размещаются в вершинах квадрата, имеющего сторону 100 Å: на одной диагонали находятся белки 1 и 3, на другой — 2 и 4. Белки 1 и 3 почти сферические, в то время как 2 и 4 — вытянутые эллипсоиды с длинной осью около 100 Å. Белок 2 ориентирован своей длинной осью вдоль направления 1 — 2, белок 4 — вдоль направления 3 — 4.

14.3. Набор тонких круговых слоев можно рассматривать как пересечение шара системой равноотстоящих плоскостей с расстоянием h между ними. По теореме свертки структурным фактором такого объекта будет свертка структурного фактора шара и структурного фактора системы плоскостей.

$$F_{\text{сумм}}(S) = \widehat{F_{\text{ш}}(S)F_{\text{пл}}(S)}$$

Выражения для структурных факторов шара $F_{\text{ш}}$ и системы плоскостей мы уже получили [см. уравнения (14.16) и (14.37)]. Чтобы решить задачу, следует рассчитать свертку, результат сначала возвести в квадрат для получения интенсивности, а затем сферически усреднить.

14.4. Показанная на рисунке картина рентгеновского рассеяния относится к β -слою, подобному тому, что изображен на рис. 13.27, А. Анализируя дифракционную картину, следует самостоятельно прийти к следующим выводам.

Обратная решетка позволяет построить прямую решетку с ячейкой $9,7 \times 6,9$ Å. Такова истинная периодичность в реальной структуре. Однако отсутствие рефлекса при $l = 1$ на меридиане рентгенограммы указывает на то, что в проекции на вертикальную ось структура повторяется через каждые 3,45 Å. Отсюда следует, что это должна быть спираль второго порядка. Подобно этому отсутствие рефлекса на экваторе при $k = 1$ предполагает, что в проекции на горизонтальную ось структура повторяется через каждые 4,85 Å. В элементарной ячейке содержатся два спиральных тяжа.

14.5. В этой задаче затронуты все аспекты рассеяния света.

а. Добавление сахарозы увеличивает показатель преломления растворителя и тем самым уменьшает контраст между макромолекулой и растворителем. Это существенно снижает рассеяние.

б. Из простых соображений, приведенных в тексте, следует, что свет, рассеянный на угол 90° (типичная геометрия, используемая при измерениях флуоресценции), должен быть полностью вертикально поляризованным. В действительности рассеяние приводит к некоторой деполаризации, так что имеется и слабый горизонтально поляризованный компонент. Использование горизонтального поляризатора приведет к исключению большей части рассеянного света. Оно исключит также и вертикально поляризованную флуоресценцию. Используя аргументы, приводимые в гл. 8, необходимо самостоятельно показать, что даже если флуорофор жестко связан с частицей, одна треть потока флуоресценции все равно будет проходить через поляризатор.

в. Следует начать с уравнений (14.70) и (14.72). Проще всего считать, что образец имеет объем 1 см^3 , поскольку это и есть объем, действительно используемый при измерении поглощения (длина пути — 1 см , а интенсивности измеряются как раз по площади 1 см^2). Следует рассчитать интенсивность рассеяния, усредненного по всем углам:

$$I_{\text{средн}} = \int_0^\pi d(2\theta) I_0 R_\theta [1 + \cos^2(2\theta)] \sin(2\theta) / r^2 \bigg/ \int_0^\pi d(2\theta) \sin(2\theta) = 4 I_0 R_\theta / 3 r^2$$

Это величина, приходящаяся на 1 см^2 площади регистрации. Чтобы рассмотреть все рассеянное излучение, надо взять любую сферическую поверхность с радиусом r , большим, чем размеры образца. Площадь этой поверхности $4\pi r^2$. Таким образом, интенсивность рассеяния по всем направлениям есть $I_s = 16\pi I_0 R_\theta / 3$, интенсивность пропущенного света есть $I = I_0 - I_s$. Оцените эту величину и возьмите соответствующий логарифм, используя разложение $\ln [1/(1 - x)] = x$; это и даст окончательный результат.

Предметный указатель

- Агарозные гели 294
Аксиальное отношение 196
— — и вязкость 275—276
— — — коэффициент трения 196—197, 198, 218
— — — определение 218—219
Активности коэффициент 208
Активный центр трипсина 393
Альдолаза 45
Амид I и II 115—116, 121
Аминокислот последовательность и интерпретация карт электронной плотности 397—398
Аминокислоты ароматические, поглощение 34—36
Амплитуда структурного фактора 319, 389
— электромагнитной волны 311
Амплитудный контраст 434
Амфолиты 302
Аналитическое ультрацентрифугирование см. Ультрацентрифугирование
Анизотропия и поляризация флуоресценции 105, 107, 108—109
— молекул собственная 286
8-Анилино-1-нафтилсульфонат (ANS) 94, 96
Аномальная дисперсия в тяжелых атомах 393
Ароматические аминокислоты, поглощение 34—36
Арчибада метод определения молекулярной массы 239, 259
Асимметричная единица 352—353
— — молекулярная масса 357
Аспартат-транскарбамоилаза 359—360
Атомные колебания в кристалле 393
Ацетон 32
Базисные спектры 79
Бактериофаг MS 2 121
— R17 424
— T2 271
— T4 182—183, 184
— T7 243
Бактериохлорофилл 53
Бензол 22
Беспорядочный клубок, ИК-спектр 117
— — спектр КД 78
— — — поглощения 34
Бесселя функция 410—411, 416
Блоха уравнения 139
— — следствия из них 142
«Боковые от вращения» 147
Больцмановский множитель 85
Борна—Оппенгеймера приближения при описании ИК-спектров 114
— — — молекулярных спектров 13
Бравэ решетки 349
Бромистый этидий 96
Броуновское движение и поляризация флуоресценции 107
— — как причина диффузии 187
— — термодинамическая интерпретация 208
Брэгга закон 345—346
Векторы межатомные и функция *Паттерсона* 376, 384, 388

- Векторы прямой и обратной решетки 355
 Векторное представление комплексных чисел 383
 — — структурного фактора 320
 — произведение 69—70
 Вероятности интеграл 214
 Вероятность как квадрат волновой функции 12
 — P_b перехода системы в данное состояние 18
 Винтовые оси 350, 352
 Вириальное разложение для вязкости раствора 273
 — — — молекулярной массы сольватированной макромолекулы 264
 Вирус кустистой карликовости 217, 238, 247, 274, 279
 — стеблевой пятнистости табака 240
 — табачной мозаики (ВТМ) 217, 238, 274, 279
 Вискозиметр капиллярный 269—270
 — ротационный 271
 Внутреннего фильтра эффект 90, 93
 Внутренняя конверсия 86—87
 Вода, ее связывание с макромолекулами 188—190
 Водородные связи, изменение ИК-спектров при их образовании 115—116, 119
 — — — спектров комбинационного рассеяния 123
 Возбуждения спектр 89, 92
 «Возмущения растворителем» метод 44—45
 Волновая функция 12
 Волокно кристаллическое 405—406
 — некристаллическое 406—407
 — полукристаллическое 405—406
 Вращательное движение молекул 107, 282
 — — — методы измерения 284, 292
 Вращательной диффузии коэффициент 108
 — — — измерение 283
 — корреляции время 109—110
 Вращательный коэффициент трения 194
 — — — влияние граничных условий 200
 — — — зависимость от формы 198—199
 — — — и гидратация 196
 — — — — коэффициент вращательной диффузии 108
 — — — связь с временем релаксации вращения 199—200
 — — — сферы 194
 Вторичная структура (конформация), ее определение по ИК-спектрам 117
 — — — — — спектрам КД 78—79
 — — — — — комбинационного рассеяния 121—122
 «Вырезающая» функция, порождаемая решеткой 342—343, 405, 406
 Выталкивающая сила 235. *См. также*
 Плавучая плотность
 Вязкость 193
 — влияние скорости сдвига на нее 270
 — и концентрация при седиментации 243—244
 — — поляризация флуоресценции 111—112
 — измерение 268
 — относительная 272
 — удельная 272
 — характеристическая 273, 274, 278
 — — для стрепния 276
 — — зависимость от молекулярной массы 276, 278—279, 281
 Газовая постоянная в единицах СГС 237
 Гамильтона оператор (гамильтониан) 14
 — — для димера 47
 Гейзенберга принцип неопределенности 15
 Гексагональная кристаллическая система 347
 — решетка 419
 Гексамеры инсулина 381
 Гель-хроматография распределительная 295
 Гель-фильтрация 294
 — объем колонки 294
 — сохранение массы 297
 — стоксов радиус (r_0) 299
 Гемоглобин 83, 189, 217, 238, 241, 274, 279, 382

- Гемоцианины 242
- Геометрическая прогрессия, сумма членов 327
- Гибкость макромолекулы 111
- Гидратации коэффициент 279
- расчет по измерению диффузии 218
- термодинамика 190
- Гидратация макромолекул 188—190
- — в кристалле 358—359
- термодинамическая интерпретация 190
- Гидратный слой 192
- Гидродинамические взаимодействия между субъединицами 201
- методы 187
- Гидростатическое давление как сила в капиллярном вискозиметре 268
- Гидрофильные и гидрофобные группы, локализация в белковой молекуле 442
- Гинье* зависимость для рентгеновского малоуглового рассеяния 423, 429
- Гипохромизм, теория 57—58
- Гипохромный эффект 57—58
- — при комбинационном рассеянии 123
- Гиромагнитное отношение 132
- — значения для некоторых ядер 133
- — электрона 167
- Гистерезис при титровании РНКазы 36
- Гликоген 181
- Гравитационная неустойчивость 215, 250
- Граничные условия, их влияние на вращательные коэффициенты трения 200—201
- — — — коэффициент трения поступательного движения 194
- Гуанидинхлорид 97
- Давления градиент 236
- Двойное лучепреломление 286—289, 291
- Двумерная решетка, рентгеновское рассеяние от нее 330, 334
- Двумерный электрофорез 305—306
- Двухфотонные процессы, их роль в комбинационном рассеянии 120
- Дебая* формула для рентгеновского рассеяния 421
- Де Бройля* соотношение 429
- Дейтерий, длина нейтронного рассеяния 438
- как нейтронная метка 442
- Дейтерированные белки 443—445
- Джонстона—Огстона* эффект 248
- Динуклеозидфосфаты, спектры КД 80
- Дипольные взаимодействия в димере 48, 52
- Дипольный момент 14, 289
- — димера 47—49, 71
- — и ориентация в электрическом поле 289
- — индуцированный световой волной 19
- — как нечетная функция 17
- — при колебательном переходе 114
- Диполя сила 50, 58. *См. также* Сила осциллятора
- Диполь-дипольные взаимодействия и гипохромизм 58
- — — перенос энергии 100
- Дирака* дельта-функция 317—318, 338—339
- обозначения 12
- Дисперсии сигнал (*и*-мода) 142
- Дисперсия диэлектрической проницаемости 291
- оптического вращения (ДОВ) 63
- — — и КД 66
- — — полужемпирический расчет 79
- Дифрактометр 363
- Дифракционная картина, ее формирование в электронном микроскопе 430, 433
- — для волокон 416
- — — влияние упаковки 417
- — — двумерной решетки 334
- — — нуклеиновых кислот 419
- — — одномерной цепочки 328
- — — периодических структур 184—185
- — — пурпурной мембраны 431
- — — системы точечных отверстий 325—326
- — — спирали 413—414
- — — α -спирали 419
- — сбор данных для ее получения 364, 366, 368—369
- — симметрия 347—348, 350—351

- Дифракция рентгеновских лучей 186, 323
— электронов и формирование изображения 430, 433
Диффузии коэффициент 209—211, 215, 449
— уравнение для вращательного движения 107—108, 283
— — — поступательного движения (перенос вещества) 210
Диффузия, ее влияние на форму седиментационной границы 234
— законы *Фика* 209
— и спектр рассеянного света 449
— — тушение флуоресценции 97
— измерение 214
— макромолекул 205
— паров 379
— при седиментации 223—224
— роль конвекции при ее измерении 582
— с учетом электростатического взаимодействия 219—220
— тяжелых атомов в кристаллах 381
Дихроизм в инфракрасной области 115—117
— измерение 289—291
— линейный 27
Дихроичное отношение 28
— — для ДНК 59
Длина волны и энергия излучения 10—11
— — — ограничения при дифракционных измерениях 360—361
— — — — измерении рассеяния 428
— — — разрешение 362
— — нейтрона 437
— — рентгеновского излучения 310—311
— — электрона 429
— нейтронного рассеяния 443
ДНК, В-форма 420
— гипохромизм 54
— дифракция 420
— дихроичное отношение 59
— зависимость коэффициента седиментации от концентрации 243
— измерение гидратации 189
— линейный дихроизм 59
— поглощение света 38—41
— — — роль конформации 41
— радиоавтография 185—186
— расчет КД 81
— седиментация 243—244
— флуоресценция оснований 93
— центрифугирование в градиенте плотности 261
Додецилсульфат натрия (ДСН) 304—305
— — комплексы с белками 304
Доплера эффект 449
Друде уравнение 68

Естественная ширина линии 147
Escherichia coli, разделение белков при электрофорезе 305
EXAFS-метод 427—428

Замораживания—травления метод 180
Зимма график 448, 450
Зимма—Крозерса вискозиметр 271—272
Зональное центрифугирование 248—251
Зональный электрофорез 302

Идеальный раствор, объем 188
Изокинетический метод 252
Изоморфное замещение 378, 381, 383, 393
Изопиестический метод измерения гидратации 189
Изоэлектрическое фокусирование 258
Импульсные методы 147—148
Индицирование слоев линий 417
— — — для волокон нуклеиновых кислот 189
— узлов обратной решетки 431
Индукцированная оптическая активность (КД) 83—84
Инкремент показателя преломления 448
Инсулин 380—381
Интенсивность дифракции (рассеяния) рентгеновских лучей 319, 323, 325
— — закон *Фриделя* 320
— — и функция *Паттерсона*
— — от одномерной цепочки 323

- — — осциллирующего диполя 445—446
- — — спирали 416
- — — спиральной линии 410
- сигнала ЯМР 141, 142—143
- флуоресценции 91
- Интеркомбинационная конверсия 86—87
- — и тушение флуоресценции 97
- Интерференционная функция 326
- — нейтронного рассеяния 445
- — одномерной решетки 323
- Интерференционные полосы 323
- Интерференция белок-белковая 444—445
- внутримолекулярная 448—449
- Инфракрасная спектроскопия 113
- Инфракрасные спектры (ИК-спектры) белков 117
- — влияние спаривания оснований 119
- — изменение при образовании водородных связей 115
- — нуклеиновых кислот 119
- Инфракрасный дихроизм 115—117
- Иод как тушитель флуоресценции 96, 97
- Ионизации степень, определение по спектрам поглощения 40
- Ионная сила 300—301
- Ифантиса* метод определения молекулярной массы 254
- Калориметрия при определении гидратации 189
- Камера вращения 362
- Каналы в кристаллах белков 380—381
- Карбоксипептидаза 80, 97, 279, 381
- Квантовая механика, основные положения 11—12
- Квантовый выход флуоресценции 86—87
- — — определение 91
- Кинетика переноса энергии 100
- тушения флуоресценции 86, 97
- флуоресценции 86, 88
- Кирквуда—Ройзмана* теория 201—202, 240—242
- Кислород как тушитель флуоресценции 97
- Клубкообразные частицы, их вязкость 274—275
- Колебания атомные в кристаллах 393
- в молекуле CO_2 114—115
- — основаниях нуклеиновых кислот 118—119
- — пептидах 115
- — α -спирали и β -слое 116—118
- Колебательные спектры 113
- — изменение их при образовании водородных связей 115
- — полимеров 115
- — расщепление полос 116
- — α -спиралей и β -слоев 115
- Колебательный переход 114
- Комбинационное рассеяние 119—123
- — влияние стэкинга 122—123
- — гиперхромный эффект 123
- Коммутация операторов 15
- Конверсия внутренняя 86—87
- интеркомбинационная 86—87
- Консервативный спектр КД 73
- Контактное взаимодействие 169
- Контакты макромолекул в кристалле 381
- Контраст 440, 442
- на паттерсоновских картах 377
- с растворителем при рентгеновском рассеянии 439
- Контрастирование образца для электронной микроскопии 429
- Конформационные изменения, анализ при помощи синтеза *Фурье* 399
- — выявление при помощи измерения КД 83
- Концентрации градиент и диффузия 210—211
- — при ультрацентрифугировании 230
- Концентрационная зависимость формы границы седиментации 244, 248—249
- — вязкости раствора 272—273
- — коэффициента седиментации 243
- — эффект *Джонстона—Огстона* 248
- Концентрация белка, ее определение по поглощению 38
- выбор при измерении поглощения 24
- Коттона* эффект 67
- Крамерса—Кронига* преобразование 66—67
- — — связь двойного лучепреломления

- и линейного дихроизма 286
- Кристалл 336
- атомные колебания 393
 - как свертка 340
 - — — мотива и решетки 349
 - контакты макромолекул 340
 - макромолекулярный, его получение 379
 - размер, необходимый для кристаллографического анализа 379
 - растворитель внутри его 379, 381
 - расчет дифракции 343—344
 - симметрия 347—348, 352
- Кристаллическая решетка 336—337, 346, 354—355
- Кристаллические системы 347—349
- Кристаллографическое исследование макромолекул 378—379
- — малых молекул 371—372
- Круговое двулучепреломление 65
- Круговой дихроизм 64
- — димера 71
 - — и дисперсия оптического вращения 66
 - — консервативный спектр 73
 - — определение вторичной структуры белков 78—79, 80
 - — поли-L-аланина 77
 - — полуэмпирический расчет 79
 - — регистрация по флуоресценции 84
 - — характерные значения параметров 66
- Куна—Томаса правило сумм 57
- Лазер, использование в спектроскопии комбинационного рассеяния 123
- — при исследовании динамического рассеяния 449
- α -Лактальбумин 423—424
- Лактатдегидрогеназа 293, 382
- Ламберта—Бэра закон 24
- — — при расчете флуоресценции 90—91
- Ламма уравнение 227, 232
- Ланжевена уравнения для диффузии 215
- — — заряженных частиц 219
- Ларморова прецессия 131
- частота 131, 133
- Лауэ условия 327, 329
- — для двумерной решетки 334
 - — — молекулярного кристалла 343
 - — — одномерной цепочки 327
 - — — трехмерной решетки 336
 - — и закон *Брэгга* 345—346
 - — — измерение рассеяния 360
- Лиганды, изучение взаимодействия с макромолекулами при помощи фурье-синтеза 398—400
- — — — — КД 83
- Лизоцим 80, 160—161, 189, 217, 238, 279, 363, 382—383
- Линейное двулучепреломление, измерение ориентации в потоке 286
- — — — — электрических полях 289, 291
- Линейный дихроизм 27
- — измерение ориентации молекул в потоке 284
 - — — — — электрических полях 290—291
 - — — — — определение ориентации хромофора 58
 - — — поли-L-глутаминовой кислоты 28
- Лоренца распределение 448
- Лоури тест 38
- Магнитного дипольного момента оператор 68—72
- Магнитное поле магнитного диполя 171
- Магнитно-электрическое взаимодействие и оптическая активность 73
- Магнитные свойства ядер 133
- Магнитный круговой дихроизм 84
- момент 130, 131—132
 - — величина 133
 - — магнетон *Бора* 132
 - — проволоочной рамки 131
 - — ядерный 132
- Малоугловое рентгеновское рассеяние 422
- Массы перенос 206
- — законы *Фика* 206
 - — при ультрацентрифугировании 227—229

- Медь, ее влияние на спектральные свойства белков 37
- Мембраны, электронно-микроскопическое исследование 431, 433
- Миллеровские индексы 345
- Миоглобин 80, 189, 279, 382, 439, 441
- Миозин 217, 238, 274
- Многокомпонентная система, зональное центрифугирование 248
- — — — равновесное ультрацентрифугирование 254
- — — — скорость седиментации 246
- Множественных изоморфных замещений метод 378
- — — — определение фаз 389—390
- — — — типичные данные 385
- Мозаичность 360
- Молекулярная масса и время упруговязкой релаксации 282
- — кристаллографическое определение 358
- — определение по данным седиментационных измерений 237
- — — — малоугловому рентгеновскому рассеянию 422
- — — — рассеянию света 448
- — — — уравнению *Шераги—Манделькерна* 278
- — — — характеристической вязкости 281—282
- — — — при помощи гель-хроматографии 299
- — — — — ДСН-электрофореза 303
- — — — — ультрацентрифугирования 257
- — — — — — равновесного 252
- — — — — с учетом сольватации 264
- — сравнение разных методов определения 239
- — средневесовая 256—257
- — определение по рассеянию света 448
- — — — — при помощи равновесного ультрацентрифугирования 255
- — среднечисленная 256
- — средняя по всему препарату 255
- — — — z -средняя
- Молекулярные сита 294—295, 298
- Молекулярный структурный фактор 322, 421
- Молярная эллиптичность 65
- Молярное вращение 65
- Момент количества движения 133
- — — — перехода 19, 26—32, 39
- — — — для поглощения и излучения 105
- — — — магнитный 73
- — — — определение направления 28—29
- — — — при ИК-спектроскопии 114
- — — — электрический 73—74
- Моноклиная кристаллическая система 347
- — — — харкеровское сечение 377
- Мотив 349—351
- Мутность 452
- Наименьших квадратов метод 79, 391, 393
- Напряжение сдвига 270—272
- — — — зависимость от него удельной вязкости 270—271
- Негативное контрастирование 178, 181—182
- Нейтронное рассеяние 437
- — дейтериевая метка 442—445
- — контраст с растворителем 439
- — локализация атомов водорода 438
- Непримитивные решетки 349, 351
- Нитроксильный (*нрет*-бутилнитроксильный) радикал 172—173
- Нормальные колебания 114
- — в антипараллельном β -слое 118
- Нормировка волновой функции 12—13
- Нуклеаза *Staphylococcus aureus* 382
- Нуклеиновые кислоты, комбинационное рассеяние 122
- — — — ИК-спектры 118—119
- — — — поглощение 38
- Обменное уширение линий в спектрах ЯМР 158
- Обобщенные силы 206, 208—209

- Обратная решетка 336—337, 355—357, 363, 367
— — узлы 360, 368
Обратное пространство в цилиндрической системе координат 409
— — описание вектора рассеяния 313—314
— — симметричное распределение интенсивности рассеяния 274
Объем гидратированной макромолекулы 109—110, 191, 235, 273
— — — и коэффициент трения 196
— дегидратированной молекулы 192
— удельный 188
— — парциальный 191—192, 217, 263
— эллипсоида 196
Овальбумин (яичный альбумин) 189, 293
Одномерная цепочка, рассеяние от нее 323, 332
Одноэлектронный член 74
Озеена тензор 201—202, 205
«Окрашивание» в электронной микроскопии (позитивное контрастирование) 178—179
Окружение хромофора, его влияние на КД 83
— — — спектр флуоресценции 94
Онзагера соотношение 219
Оператор дипольного момента 14, 71—72
— потенциальной энергии 14
— — — димера 47—48
Операторы 14
— как матрицы 19
— собственные значения 14, 20
— среднее значение 14
Оптическая активность индуцированная 83—84
— — физические основы 68
— — экспериментальное исследование 63
— дифракция, анализ электронно-микроскопических фотографий 184
— — на решетках 324
— ось 288
— плотность 24
Оптическое вращение 63, 66
— — в двоякопреломляющей среде 287
— — величина 63
 π -Орбиталь 30
Ориентация в потоке, измерение с помощью двойного лучепреломления 286
— — — — — дихроизма 284
— молекул в потоке 284—289
— — — электрическом поле 289
Ориентированные молекулы 27—29
— образцы, приготовление 27
Ортонормированность 15
У-основание, флуоресценция 92
Основания, спектры поглощения 38—41
Оствальда вискозиметр 269
Осциллятора сила 26—27, 58
Ось волокна 416
Оттенеение образца для электронной микроскопии 178—179, 181, 182

Панкреатическая рибонуклеаза 36
Папаин 381
Парамагнитные зонды 156
Паров диффузия 378
Парциальный удельный объем 191—192, 217
— — — с учетом сольватации 263
Паттерсона функция изоморфная разностная 384
— — как свертка 374
— — периодичность 375
— — радиальная 426—427, 444
— — развертка 376
— — сферическое усреднение 427
Паттерсоновская карта 376—377
— — перекресты 386
— — разностная 384—387
Пептидная группа, ИК-спектр 115
— — поглощение 33—34
— — колебания 115
Передаточная функция 430—431
Перекрестно-фазовый разностный синтез *Фурье* 392
Перенос массы 206. *См. также* Поток вещества
— — при ультрацентрифугировании 227—229
— энергии, эффективность 98—100

- Переход запрещенный 32
 — разрешенный 31
 $n \rightarrow \pi^*$ -Переход 30
 — влияние растворителя 43
 — у ацетона 32
 — — пептидов 33
 $\pi \rightarrow \pi^*$ -Переход 30
 — влияние растворителя 43
 — у нуклеозидов 38
 — — пептидов 33—34
 — — формальдегида 31
 Периодические структуры, дифракционная картина от них 184—185
Перрена фактор формы 197, 199
 — — — для стержня 304
 — — — и коэффициент Симхи 277
 — — — — теория *Кирквуда—Райзмана* 203
 — — — — определение в эксперименте 218
 — — — — по седиментации 240
 — уравнение 11, 198—199
 Плавающая плотность 260
 Плато концентрации при ультрацентрифугировании 224, 230, 233
 Плотности градиент 262—263
 — — при зональном центрифугировании 249—251
 — — солевые растворы 250
 — — эффективный 264
 Плотность оптическая 24
 — плавающая 260
 Поглощение 24
 — альдозазы 45
 — ароматических аминокислот 34—36
 — ацетона 32
 — белков 33—38
 — влияние температуры 40
 — димера 46—53
 — измерение 23—24
 — пептидной группы 33—34
 — поли-L-глутаминовой кислоты 28
 — поли-L-лизина 34
 — природа спектральных полос 18
 — простетических групп 37
 — расчет для тримера 61
 — роль локального окружения хромофора 42
 — света, поляризованного по кругу 64—65
 — смесей белков и нуклеиновых кислот 41
 — спектр димера 50—51, 52—53
 — уширение спектральных полос 23
 Поглощения сигнал (ν -мода) 142
 Подвижность электрофоретическая 299, 304—305
 Позитивное контрастирование 178
 Поли-L-аланин, КД 77
 — комбинационное рассеяние 122
 — рентгеновское рассеяние 415
 Поли- γ -бензил-L-глутаминовая кислота, вязкость 274, 279
 — ИК-дихроизм 117
 Поли-L-глутаминовая кислота, линейный дихроизм 28, 59
 — — поляризация полос поглощения 54
 Полиголовка бактериофага T4 184
 Поли-L-лизин, гипохромизм 54
 — комбинационное рассеяние 122
 — спектр поглощения 34
 Поли- γ -метил-L-глутамат, рентгеновское рассеяние 416
 Полипролин II, перенос энергии 103
 Полукристаллическое волокно, определение упаковки 419
 — — рентгеновское рассеяние 405—407
 Полуэмпирический расчет КД и ДОВ 79
 — — оптической активности белков 77
 — — — — нуклеиновых кислот 79
 Поляризации степень и движение хромофора 111—112
 — — — уравнения *Перрена* 110
 — — предельное значение 107
 Поляризация и анизотропия 105
 — перехода в формальдегиде 31
 — полос поглощения в ИК-спектрах 116
 — флуоресценции 104
 Поляризованный свет 63—64
 — — и направление электрического поля 16
 — — по кругу 64
 — — поглощение 54
 — — рассеяние 446
 Поляризуемость 55, 56
 — ароматических хромофоров 57
 — и двойное лучепреломление 291

- диэлектрическая постоянная 292, 447—448
- показатель преломления 448
- индуцированного диполя 19
- плоских хромофоров 58
- при комбинационном рассеянии 120
- — рассеянии света 445
- Пор размер при гель-хроматографии 298
- — ДСН-электрофорезе 304
- Поток вещества 206. *См. также* Перенос массы
- при ультрацентрифугировании 228, 236
- уравнение в разных системах координат 207
- Преломление света и поляризуемость 55
- Преломления показатель, инкремент 448
- света поляризованного 65, 286—288
- Препрессионная камера 362
- Примитивная решетка 49
- Природные соединения, относительное содержание в них некоторых ядер 133
- Проекция, восстановление структуры по набору проекций 433
- определение положения лиганда 400
- оценка фаз 390
- разностная паттерсоновская 387
- распределения электронной плотности 367
- β -слоя 365
- центросимметричная 385—386, 390—391, 400
- Произведение векторов 69—70
- векторное
- скалярное 69
- тензорное
- Пропускания функция 434
- Протестические группы 36—37
- Пространственная группа 347—348, 352—354
- и симметрия макромолекулы 359
- определение 357
- симметрия 352
- Противоионы, влияние на электрофоретическую подвижность 299—300
- и диффузия ионов 219—220
- параметр экранирования 300
- при гидратации 188
- Противоток при центрифугировании 226, 243—244, 246
- Протонирование, влияние на спектры поглощения 40
- Протонный магнитный резонанс (ПМР) 159
- обмен и контраст с растворителем 440
- — изучение с помощью нейтронной дифракции 440
- Пуазейля закон* 269
- Пуассона—Больцмана уравнение* для заряженной сферы 300
- Пурпурная мембрана 431, 433
- pH, влияние на спектры поглощения 35, 36, 40
- poly (C), дифракция от волокон 419
- poly (dA · dT), КД 81—83
- poly (rA · rU), ИК-спектр 119
- poly (rG · rC), ИК-спектр 119
- Равновесие мономер—димер при седиментации 245, 257
- Равновесия константа 257
- Равновесное ультрацентрифугирование 252, 259
- в градиенте плотности 260—264
- — *Касасы—Эйзенберга* теория 265
- — определение молекулярной массы 239, 252
- — системы мономер—димер 257
- Радиальная функция *Паттерсона* 426—427
- — для рибосомных белков 444
- — распределения 425
- Радиальное разбавление при ультрацентрифугировании 231, 235
- Радиационное время жизни 86
- Радиоавтография 185
- Радиус инерции 422
- влияние контраста на его определение 440—442
- для дискретных рассеивающих элементов 441
- — α -лактальбумина 423, 424

- Радиус инерции миоглобина, зависимость от контраста 441
 — — — определение при малоугловом рассеянии 423
 — — — — рэлеевском рассеянии света 449
 — — — электрона 423
 — — — спирали 411
 Размерности анализ при выводе закона *Стокса* 194
 — — — расчете внутренней вязкости 273
 Разностные паттерсоновские карты (проекции) 384—389
 — спектры белков при «возмущении растворителем» 44
 — — — регистрация 23
 Разрешение карт электронной плотности 394—395
 — при рентгеновской дифракции 364—366, 368
 — — — электронной микроскопии 178
 Распределения коэффициент 294—296
 — — — и молекулярная масса 298
 Рассеивающая плотность 439—440
 Рассеивающий фактор атомный 321—322
 — — — для трехмерной решетки 336
 — — — зависимость от температуры 393
 — — — для электрона 438
 — — — как комплексная величина 394
 Рассеяние неупругое 449
 — от однородного образца 320
 — рентгеновское *см.* Рентгеновское рассеяние
 — света 445
 — — — и поляризация 446—447
 Рассеяния вектор 313—314
 — — — и законы *Брегга* 345—346
 — — — сфера отражения 328—329
 — — — одномерной цепочки 327—328
 — геометрия 312, 331—332
 — длина 437—438, 443
 — — — для электрона 438
 — — — угол 313
 — — — кристаллической решетки 355
 — — — от узлов обратной решетки 345
 Расстояние между хромофорами и гипохромизм 58
 — — — — КД 73
 — — — — перенос энергии 100
 — — — — экситонные взаимодействия 49
 Растворитель и стоксов сдвиг 89
 — влияние на спектры поглощения 42—45
 — — — стабильность α -спирали 278—279
 Расщепление полос колебательных спектров 116
 — сверхтонкое анизотропное 170
 — — — константа 168
 — спектральных линий для димера 52—54
 — спин-спиновое 153
 Расщепления константа 154—155
 Резонансное комбинационное рассеяние 123
 Релаксация колебательная 87—88
 — поперечная 137
 — — — измерение импульсными методами 147—148
 — — — факторы, влияющие на ее время 146—147
 — — — продольная 135, 137, 139
 — — — большие времена 143
 — — — влияние вязкости 144
 — — — локальных полей и окружения 143
 — — — — на ширину линий в спектре ЭПР 145
 — — — измерение 147
 — упруговязкая 280—282
 Рентгеновская дифракция от двумерной решетки 330
 — — — одномерной цепочки 326—329, 333
 — — — трехмерной решетки 334
 — — — разрешение 364—366
 — камера 355
 — — — вращения 362
 — — — прецессионная 362—363
 — кристаллография *см.* Кристаллографическое исследование макромолекул
 Рентгеновское излучение, длина волны 264—265
 — — — природа и источник 309—310

- Рентгеновское рассеяние в растворе 421
— — геометрия опыта 312—314
— — и нейтронное рассеяние 437, 439
— — малоугловое, зависимость *Гинье* 423
— — миоглобина 439
— — описание с помощью фурье-преобразования 315
— — от волокон 405—407
— — — нуклеиновых кислот 419—420
— — — отдельного атома 320—322
— — — раствора бактериофага R17 425
— — — спирали 407—408
— — расчет с помощью свертки 343
— — широкоугловое 423
- Решетка(и) 330, 333—336, 346—351
— *Бравэ* 349
— вырезающая функция 343
— двумерная 330, 333
— кристаллическая 336—337, 346, 354—355
— непримитивная 349, 351
— обратная 355
— описание с помощью дельта-функции 339—340
— определение параметров 354
— оптическая дифракция 324—325
— примитивная 350
— рассеяние рентгеновских лучей 323, 330
— рентгеновская дифракция 333
— свертка 338
— система плоскостей 344—345
— спиральная 408
— трехмерная 336—337, 346
- Рибонуклеаза 372
— панкреатическая (А) 36, 163—164, 217, 238—239, 274, 372
- Рибосомная РНК, график *Зимма* 450
- Рибосомы, нейтронное рассеяние 444
— электронная микроскопия 180
- Ричард-бокс 397
- Ромбическая кристаллическая система 347, 357
- Ромбоэдрическая кристаллическая система 347
- Ротационный вискозиметр 271—272
- Рэлеевское отношение 447
— рассеяние света 445
- R-фактор 338
- Сахароза, результаты исследования диффузии 217
— молекулярная масса 217, 239
- Сахарозный градиент 251
- Сведберга* единицы 228
— уравнение 235
- Свертка 338
— описание спирали 407—408
— функции *Паттерсона* 374
— представление повторяющейся структуры 338
— рассеяние от спирали с нецелым числом остатков на виток 414
— — — целочисленной спирали 413
— расчет картин рентгеновской дифракции 341
— — структурного фактора 407, 413—414
— фурье-преобразование 340—341
- Сверхтонкого расщепления константа 168
- Сверхтонкое взаимодействие 167
— — анизотропное 169, 170—172
— — контактное 169—170
— — неоднородное уширение линий 169
- Свет (световая волна), взаимодействие с молекулой 10, 16
— длина волны 11, 428—429
— поляризация 446
- Свободное протекание 205
- Свободный объем колонки 294
- Сдвиг спектра поглощения 43
— — — кажущийся 53
- Седиментации коэффициент 228
— — анализ для стрепто 240
— — зависимость от концентрации 242—243
— — значения 238
— — и измерение вязкости 277
— — определение по плато концентрации 233
— — — — положению границы 233
— — — поправки на условия измерения 237—238

- Седиментации коэффициент средневесовой 245
 — — сферических молекул 239
 Седиментационная граница 223—224
 — — в многокомпонентной системе 246, 248
 — — влияние диффузии и полидисперсности 234—235
 — — — самоассоциации 244
 — — определение коэффициента седиментации 233
 — — при ультрацентрифугировании 230
 — — сужение 244
 Седиментационное равновесие см. Равновесное ультрацентрифугирование
 Седиментация под действием силы тяжести 223
 — скорость переноса массы через поверхность 227—228
 Сефадекс 294, 298
 Сечение поглощения 25
 Сила вращения 68
 — диполя 26—27
 — осциллятора 26
 — тяжести при седиментации 223
 Симметрия макромолекулы 359—360
 — молекул и кристаллов 352
 — молекулярных орбиталей и составляющих оператора дипольного момента 31
 — пространственные группы для биологических молекул 352—354
 — решетки 351
 — типы 352
 — элементарной ячейки 347—348
 Симхи коэффициент 199, 275
 — — зависимость от аксиального отношения 275—276
 — — и другие результаты гидродинамических измерений 293
 — — — фактор *Перрена* 276—277
 Синглет-синглетный перенос энергии 97, 101
 Скоростей распределение в жидкости 193—195
 Слоевые линии 331
 — — и функции *Бесселя* 416
 — — индицирование 418
 — — — для волокон нуклеиновых кислот 420
 — — — — обратной решетки пурпурной мембраны 431
 — — при рентгеновском рассеянии от спирали 413—415
 β -Слой, рентгеновская дифракция 365—366
 — спектр инфракрасный 115—116
 — — кругового дихроизма 78
 — — поглощения 34
 Собственная анизотропия молекул 286
 — функция 14, 20
 — — для димера 47, 49
 — — ортонормированность 15
 Собственное состояние 14—15
 Собственные значения оператора 14, 20
 Сольватации коэффициент 263
 Сохранение массы при гель-фильтрации 297
 — — — диффузии 211
 — — — равновесном ультрацентрифугировании 253
 — — — седиментации 229
 Спаривание оснований, влияние на инфракрасные спектры 119
 Спектроскопия поглощения 10. См. также Поглощение
 Спиновое квантовое число ядра 132—134, 168
 — — — электрона 167
 — — эхо 148—149
 Спиновые состояния электрона 168
 Спиновый обмен 146—147
 Спин-спиновое расщепление 153
 Спираль, геометрическое описание 408—409
 — описание с помощью свертки 407—408
 — рентгеновское рассеяние 407
 — с нецелым числом остатков на виток 414
 — — целым числом остатков на виток 413
 — структурный фактор 409—410
 — точечная 411—413

- α -Спираль, ИК-спектр 115—116
- круговой дихроизм 78
- линейный дихроизм 28
- поглощение 28, 54
- рентгеновское рассеяние 418
- — — предсказание 412
- характеристическая вязкость 278—279
- Стационарное состояние 15
- — димера 48—49
- Степень анизотропии и поляризации 105
- Стержень, вязкость 276
- и клубок, разница в вязкости 278
- ориентация в градиенте скорости 284
- седиментация 240
- электрофорез в ДСН 303—304
- Стокса закон 194
- Стоксов радиус при гель-фильтрации 299
- — сферы 218
- сдвиг 89
- Структурный фактор 314, 319—320
- — в сферических координатах 321
- — волокна кристаллического 405
- — — некристаллического 407
- — — полукристаллического 405—407
- — для изоморфных производных 383, 386
- — — центросимметричной проекции 387
- — — как комплексное число 319
- — — функция положения атома 322
- — — фурье-образ 315
- — комплекса белка с лигандом 399
- — молекулярного кристалла 343—344
- — образца с центром симметрии 322
- — однородной сферы 424
- — расчет с помощью свертки 342
- — ряда параллельных плоскостей 412
- — β -слоя 365—366
- — спирали 409—410
- — — непрерывной 408—409
- — — одиночной 407—408
- — — точечной 411
- — трехмерной решетки 336
- — уравнение 344
- Стэкинг, влияние на спектр комбинационного рассеяния 122—123
- и гипохромизм 57
- — КД 81
- Сфера ограничения 330, 361, 364
- отражения 328, 354, 360, 361, 428
- — при дифракции от волокон 417
- Сывороточный альбумин 95, 189, 217, 238—239, 243, 274, 292
- Температурный эллипсоид 393
- Температура, влияние на спектр поглощения 40
- — — флуоресценцию 88
- Тетрагональная кристаллическая система 347
- Тетрагональный кристалл 363
- Тирозин 34—35
- Титрование спектрофотометрическое 36
- Транспортная РНК (тРНК), затухание флуоресценции 92
- — спектр необычных оснований 41
- Трения коэффициент для гидратированной макромолекулы 196
- — зависимость от расположения субъединиц 203—204
- — и смачивание 194
- — как функция аксиального отношения 199, 218
- — молекул сложной формы 202
- — определение по измерению диффузии 218
- — поступательного движения 192
- — при вращательном движении 292—293
- — сферической частицы 193—194
- — эллипсоидов вращения 196—199
- — — гидратированных 217—218
- сила и вязкость 192—193
- Трехкомпонентная система, диффузия 219
- — центрифугирование в градиенте плотности 261—264
- — седиментация 236—237
- Трехмерная решетка 334, 336—337, 340
- Триклинная кристаллическая система 347
- Триклинный кристалл, прецессионная рентгенограмма 383

- Триклинный кристалл, прямая и обратная решетки 357
- Тример нуклеотидов, спектр КД 81
- хромофоров, спектр поглощения 60—61
- Трипсин 395—396
- Триптофан, поглощение 34—35
- флуоресценция 93, 95
- Тропомизин 217, 238, 274
- Тушение флуоресценции 86—87, 96—97
- Тяжелая вода (D_2O) в ИК-спектроскопии 113
- — контраст при нейтронном рассеянии 439—440
- Тяжелые атомы, аномальная дисперсия 394
- — в цитохроме *c* 392
- — влияние на структурные факторы 383—384
- — определение положения 376, 385, 391
- — получение тяжелоатомных производных макромолекул 381
- — при кристаллографическом исследовании макромолекул 379
- — — определения структуры малых молекул 371—372
- — приготовление образцов для электронной микроскопии 179
- Угловое распределение атомного рассеивающего фактора 321
- — рассеянного света 446
- Удельный объем 188
- Узлы обратной решетки 350—361
- Ультрацентрифуга 224
- Ультрацентрифугирование 226—227
- в градиенте плотности 260
- — — — солевые растворы 250
- — — — трехкомпонентная теория 261
- движение растворителя в ячейке 226—227
- метод отрыва от мениска 254
- плато концентрации 224, 230, 233
- радиальное разбавление 231, 235
- смесительная камера для создания градиента 251
- сохранение массы 253
- ячейки 225—228, 246—247, 252, 266
- Упаковка молекул, исследование с помощью рентгеновской дифракции 418—419
- Усреднение для улучшения качества электронной микрофотографии 182
- по вращению 414
- рассеяния от раствора по всем возможным ориентациям молекул 421
- Уточнение карт электронной плотности 397
- положений тяжелых атомов 393
- по методу наименьших квадратов 373, 391—392
- структуры малой молекулы 372—373
- *Фурье* 372
- Фаза, определение в электронной микроскопии 431, 433
- относительная при возбуждении димеров 52
- — — диполей 20
- — и индуцированные диполи 56
- структурного фактора 319
- — — для центросимметричной проекции 366, 385
- электромагнитной волны 311—312
- Фазовая проблема в рентгеновской кристаллографии 369
- — определение фазы структурного фактора методом изоморфного замещения 389—390
- Фазовый контраст 434
- сдвиг (сдвиг фазы, разность фаз) двух волн 311—312
- g*-Фактор, анизотропия 173
- быстро вращающихся молекул 173
- свободного электрона 132, 167, 173
- R*-Фактор 378
- Феноменологические коэффициенты 206
- — и уравнение *Сведберга* 236
- Феноменологическое уравнение для потока вещества 207
- — — трехкомпонентной системы 262

- — и вывод уравнения *Сведберга* 236
- — — перенос массы 227
- Ферми* взаимодействия 169
- золотое правило 101
- Фёрстера* теория 101
- Фибриллярные белки, измерение вязкости 274
- — — диффузии 217
- Фибриноген 217, 274
- Фиброин шелка 451
- Фика* законы 209
- — в движущейся системе координат 297
- — вывод уравнения *Ламма* 228
- — для вращательной диффузии 283
- — интерпретация коэффициентов диффузии 216
- уравнений решение 212
- Фильтрация изображений 183—184
- Флавины, спектральные свойства 37
- Флуоресцеинизотиоцианат 94
- Флуоресцентная спектроскопия 84
- — методы измерения 89
- — сывороточного альбумина 95
- Флуоресцентные метки 93—94, 96
- Флуоресценция 91
- анизотропия 105, 109—110
- влияние окружения хромофора 94
- — температуры 88
- затухание 88, 91—92
- интенсивность 86—88
- квантовый выход 86, 88, 91
- поляризация 104
- тушение 110
- Флуоресцирующие группы 93
- Форма границы седиментации 245
- зоны при зональном центрифугировании 249
- молекулы и вращательное трение 197—201
- — — вязкость 275—276
- — — трение поступательного движения 196—197
- — — определение по гидродинамическим данным 292
- — — — поляризации флуоресценции 111
- — — — седиментационным данным 239, 240
- Формальдегид 29—31
- молекулярные орбитали 30—31
- Фосфоресценция 87—88
- Фотоселекция 104
- Фриделя* закон 274, 393
- — при дифракции электронов 434
- Фурье-преобразование, улучшение качества изображения в электронном микроскопе 184
- при описании дифракции электронов 433—436
- — — рентгеновского рассеяния 316
- — решении уравнений диффузии 213
- свертки 340, 408
- свойства 315
- спинового эха 148—149
- Фурье* ряд 315—316
- синус-преобразование 356
- Фурье-фильтрация 184
- Фурье*-синтез 391—392, 398—400, 433
- анализ конформационных изменений 399
- изучение взаимодействия макромолекулы с лигандом 398
- при расчете электронной плотности 370
- Харкера* сечения 377
- Химический потенциал 208
- — его градиент в трехкомпонентной системе при ультрацентрифугировании 262
- — — — при седиментации 236
- сдвиг 149
- Химотрипсин 109, 381
- Хромосома, определение молекулярной массы 282
- Хромофоры 32—33, 45
- Цезий хлористый (CsCl), градиент плотности 260—261, 262
- Центр симметрии, оценка фаз 390

- Центр симметрии при связывании лиганда 400
- — β -слоя 366
 - — упрощение структурного фактора 322
- Центрифугирование см. Седиментация, ультрацентрифугирование
- в градиенте плотности, теория 260—264
 - зональное 248—251
 - приближение к равновесию 259
 - равновесное 239, 252, 257, 260—265
 - соударение молекул со стенками ячейки 226—227
- Цитохром с 279, 382, 387, 392
- Черного тела излучение 85
- Червертичная структура аспартат-транс-карбамоилазы 359—360
- — влияние на гидродинамические свойства макромолекул 201—202
 - — определение с помощью нейтронного рассеяния 443—444
- Число остатков на виток спирали для молекулы белка 418
- — — — — нуклеиновой кислоты 420
- Шаг спирали 411
- — определение по рентгеновской дифракции от волокон 410, 418
- Шераги—Манделькерн* метод определения молекулярной массы 239, 277—278
- параметр 199, 274—275, 277
 - уравнение 277—278, 293
- Ширина линий естественная 147
- — спектров ЯМР 145
- Широкоугловое рентгеновское рассеяние 423
- Шлирен-оптика, анализ приближения к седиментационному равновесию 259
- в ультрацентрифуге 233
 - измерение диффузии 214
- Шредингера* уравнение 14—15
- — для димера 48
 - — — взаимодействия со световой волной 17
- Эйнштейна* коэффициенты 19, 26, 85
- Эйнштейна—Сазерленда* уравнение 216, 283
- Экранирования параметр при противоионных эффектах 300
- Экситонное расщепление 50
- — для димера 52
 - — — сложных молекул 53—54
- Экспоненты, связь с тригонометрическими функциями 311—312
- Экстинкции коэффициент 23—27
- — и поляризуемость 56
- Электромагнитная волна, описание 310—311
- Электрон, длина волны 429
- рассеивающий фактор 421
 - рентгеновское рассеяние 314
- Электронная дифракция 429
- — математическое описание 433
 - — микроскопия 178
 - — амплитудный контраст
 - — артефакты 179
 - — контрастирование 178—179
 - — определение структуры молекул 433—434
 - — пурпурной мембраны 431
 - — разрешение 178, 428
 - — фазовый контраст 434
 - — формирование изображения 430, 433
 - — плотность 314
 - — интерпретация 394
 - — карты 372, 395—396
 - — распределение 315, 335, 369
 - — расчет 424
- Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) 167
- — — гиромангнитное отношение 167
 - — — металлсодержащих белков 174
 - — — сверхтонкое расщепление, константа 168
 - — — спиновая метка 174—175
 - — — условие резонансного поглощения 168
 - — — химический сдвиг 149
 - — — g -фактор, анизотропия 173
- Электростатические взаимодействия при диффузии 219—220

- Электростатические эффекты и результаты гидродинамических измерений 188—189, 192
 Электрострикция см. Электростатические эффекты
 Электрофоретическая подвижность 299, 304—305
 — — влияние на нее противоионов 299—300
 Электрофорез 299
 — в ДСН 303
 — двумерный 305—306
 — зональный, конвекция 302
 — с движущейся границей (свободный электрофорез) 301
 Эллипсоиды вращения, вязкость 275
 — — и теория *Кирквуда—Райзмана* 203
 — — коэффициент трения 196—199
 — — объем 196
 — — при анализе рентгеновского рассеяния 423
 Эллиптически поляризованный свет 64
 Эллиптичность 63, 65—66
 Энергетические уровни молекул 21—23
 Энергии перенос 100—103
 — — и флуоресценция белков 93
 — — — измерение расстояния между хромофорами 100
 — — синглет-синглетный 97, 101, 112

Ядерный магнитный резонанс (ЯМР) 129
 — — — биологических систем 159—167
 — — — время поперечной релаксации 137—146
 — — — — продольной релаксации 135
 — — — гиромангнитное отношение 132
 — — — ларморова прецессия 131
 — — — магнетон *Бора* 132
 — — — магнитные свойства некоторых ядер 133
 — — — магнитный момент 130—131
 — — — — — ядер 132
 — — — относительная чувствительность 135
 — — — парамагнитные зонды 156
 — — — спиновое квантовое число 132
 — — — спиновый обмен 146
 — — — спин-спиновое расщепление линий 154
 — — — уравнения *Блоха* 139—142
 — — — — — интенсивность сигнала поглощения 143
 — — — *g*-фактор 132
 — — — физическая основа эксперимента 135—139
 — — — химический сдвиг 149
 — — — ширина линий 145
 — — — — естественная 147
Ядра, магнитные свойства 133
 — относительное содержание в природных соединениях 133
ЯМР-спектр(ы) 149
 — аденина в D_2O 150
 — белков, содержащих ^{13}C 161
 — гистидиновых остатков в рибонуклеазе А в D_2O 161
 — дрожжевой тРНК 166
 — лизоцима в D_2O 160
 — нуклеиновых кислот 165
 — стафилококковой нуклеазы 152
 — 9-этилгуанина и 1-метилцитозина и их смеси 166
Ячейка кристалла элементарная 337, 347—349
 — объем 337
 — обратная 356—357

Оглавление

ТОМ 2

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ БИОПОЛИМЕРОВ

<i>Глава 7. Спектроскопия поглощения. Перевод А. П. Минеева</i>	10
7.1. Основные принципы	10
Область применения	10
Качественное описание спектроскопии	10
Квантовомеханическое описание молекулярных свойств	11
Описание состояния молекулы при помощи волновой функции	12
Операторы и значения наблюдаемых величин	14
Уравнение Шредингера	14
Взаимодействие света с молекулой	16
Момент перехода	19
Параметры, которые можно определить из спектральных данных	19
7.2. Спектроскопия поглощения в области электронных переходов	21
Энергетические состояния молекул	21
Коэффициент экстинкции	23
Связь между коэффициентом экстинкции и некоторыми молекулярными свойствами	26
Линейный дихроизм ориентированных образцов	27
Спектральные свойства простых молекул: формальдегид	29
7.3. Спектроскопия биополимеров	32
Спектральная область, в которой проводятся исследования биополимеров	32
Поглощение белков в дальней УФ-области определяется пептидными группами	33
Поглощение белков в ближней УФ-области обусловлено ароматическими аминокислотами	34
Влияние простетических групп	36
Определение концентрации белка из данных по УФ-поглощению	38
Поглощение нуклеиновых кислот определяется основаниями	38
7.4. Влияние конформации на поглощение	41
Влияние на спектры локального окружения хромофоров	42
Взаимодействия между разными хромофорами	45
Димер, состоящий из не взаимодействующих мономеров	46
Димер, состоящий из взаимодействующих мономеров	48
Как анализировать спектр димера	52

Число полос поглощения и число хромофоров	53
Гипохромизм агрегатов хромофоров	54
Определение ориентации хромофора при помощи линейного дихроизма	58
Краткие выводы	60
Задачи	60
Литература	62
Глава 8. Другие оптические методы. Перевод А. П. Минеева	63
8.1. Оптическая активность	63
Экспериментальное исследование оптической активности	63
Соотношение между ДОВ и КД	66
Физические основы явления	68
Вычисление КД димера	71
Полуэмпирические расчеты оптической активности белков	77
Полуэмпирические расчеты оптической активности нуклеиновых кислот	79
Применение оптической активности при эмпирических расчетах	83
Другие разновидности метода измерения оптической активности	84
8.2. Флуоресцентная спектроскопия	84
Основные принципы флуоресценции	84
Факторы, влияющие на интенсивность флуоресценции	86
Методы измерения	89
Свойства типичных флуоресцирующих групп	93
Чувствительность флуоресценции хромофора к окружению	94
Синглет-синглетный перенос энергии	97
Измерение расстояния между хромофорами по данным об эффективности переноса энергии	100
Поляризованная флуоресценция	103
Поляризация в жестких системах	104
Влияние молекулярного движения	107
Уравнения Перрена и измерение стационарной степени поляризации	110
8.3. Инфракрасная спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния	113
Принципы, лежащие в основе инфракрасной спектроскопии	113
Колебательные спектры полимеров	115
Спектроскопия комбинационного рассеяния	119
Краткие выводы	123
Задачи	124
Литература	126
Глава 9. Введение в магнитный резонанс. Перевод А. П. Минеева	128
9.1. Резонансные методы и их применение	128
9.2. Общие принципы ядерного магнитного резонанса (ЯМР)	129
Прецессия заряженного волчка в магнитном поле	130
Магнитный момент ядер	132
Ограничения, налагаемые на ядерные магнитные моменты	134
Физическая основа эксперимента по ЯМР: классическая аналогия	135
9.3. Уравнения Блоха	139
9.4. Важные следствия, вытекающие из уравнений Блоха	142

Интенсивность сигнала	142
Большие времена продольной релаксации (T_1)	143
Влияние флуктуирующих локальных полей и окружения на T_1	143
Влияние T_1 и T_2 на ширину линии	145
Факторы, влияющие на T_2	146
Измерение T_1 и T_2 импульсными методами	147
Спектр поглощения как фурье-преобразование спинового эха	148
9.5. Особенности спектров ЯМР	149
Химический сдвиг	149
Получение высокого разрешения	151
Спин-спиновое расщепление линий	153
Исследования биологических комплексов с помощью парамагнитных зондов ...	156
Применение ЯМР для регистрации динамических процессов	157
9.6. Спектры ЯМР биологических систем	159
Спектры протонного магнитного резонанса белков	159
^{13}C -ЯМР-спектры белков	161
ЯМР на ядрах ^{31}P	162
Использование ^{19}F в качестве зонда при исследовании биохимических систем	163
Спектры ЯМР нуклеиновых кислот	165
9.7. Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР)	167
Сходство между ЭПР и ЯМР	167
Сверхтонкое взаимодействие	167
Контактное взаимодействие	169
Анизотропное сверхтонкое расщепление	170
Анизотропия g -фактора	173
Исследования с помощью ЭПР металлсодержащих белков	174
Исследования методом ЭПР с применением спиновой метки	174
Краткие выводы	175
Задачи	176
Литература	177
Глава 10. Размер и форма макромолекул. Перевод Ю. Н. Косаганова	178
10.1. Методы прямого наблюдения	178
Электронная микроскопия молекул	178
Уменьшение вероятности появления артефактов, связанных с высушиванием и усадкой в процессе подготовки образцов для электронной микроскопии	180
Использование симметрии для улучшения электронно-микроскопического изображения	182
Радиоавтография высокого разрешения	185
Дифракция рентгеновских лучей	186
10.2. Гидродинамические методы исследования макромолекул	187
Обзор методов	187
Объем и гидратация макромолекул	188
Термодинамика гидратации	190
Трение макромолекул в растворе	192
Связь между трением и размерами молекулы	193
Влияние формы частиц на трение поступательного движения	196
Влияние формы на вращательное трение	197
Трение при поступательном движении молекул сложной формы	201
Коэффициенты трения олигомеров и полимеров	204

10.3. Диффузия макромолекул	205
Перенос массы как поток вещества	206
Законы диффузии Фика	209
Решения уравнений Фика	212
Измерение диффузии	214
Интерпретация коэффициента диффузии с молекулярной точки зрения	215
Интерпретация измеренных значений коэффициентов трения	217
Диффузия в многокомпонентных системах	219
Краткие выводы	220
Задачи	221
Литература	221
<i>Глава 11. Ультрацентрифугирование. Перевод Ю. А. Банникова</i>	<i>223</i>
11.1. Скоростная седиментация	223
Седиментация под действием силы тяжести или центробежной силы	223
Ультрацентрифуга	224
Описание процессов переноса в ультрацентрифуге: уравнение Ламма	227
Решение уравнения Ламма при постоянном s и в отсутствие диффузии	229
Решение уравнения Ламма для более реалистических случаев	232
Определение коэффициента седиментации по положению границы	233
11.2. Анализ результатов седиментационных измерений	235
Уравнение Сведберга	235
Определение молекулярных масс по данным седиментационных измерений	237
Что можно узнать о форме и конформации по данным седиментационных измерений	240
Зависимость скорости седиментации от концентрации	242
Влияние самоассоциации на скорость седиментации	244
Как влияет на скорость седиментации присутствие в системе нескольких макромолекулярных компонентов	246
Зональное центрифугирование многокомпонентных систем	248
11.3. Равновесное центрифугирование	252
Определение молекулярной массы при помощи равновесного центрифугирования	252
Равновесное центрифугирование смесей макромолекул	254
Центрифугирование равновесной системы мономер-димер	257
Анализ приближения к равновесию	259
Центрифугирование в градиенте плотности: упрощенная теория	260
Центрифугирование в градиенте плотности: трехкомпонентная теория	261
Краткие выводы	265
Задачи	266
Литература	267
<i>Глава 12. Другие гидродинамические методы. Перевод Ю. А. Банникова</i>	<i>268</i>
12.1. Вискозиметрия	268
Измерение вязкости	268
Влияние скорости сдвига на величину измеряемой вязкости	270
Влияние молекул растворенного вещества на вязкость раствора	272
Зависимость вязкости от формы молекул	275
Определение молекулярной массы с помощью измерений вязкости	277

Некоторые случаи применения вискозиметрических измерений	278
Упруговязкая релаксация	280
12.2. Методы, использующие вращательное движение молекул	282
Измерение преимущественной ориентации в потоке с помощью линейного дихроизма	284
Измерение преимущественной ориентации в потоке с помощью линейного двойного лучепреломления	286
Ориентация в электрических полях	289
Дисперсия диэлектрической проницаемости	291
Другие способы измерения и интерпретации вращательных движений	292
12.3. Хроматография на молекулярных ситах	294
Сущность явления гель-фильтрации	294
Анализ профилей элюируемых зон	296
Свойства молекулярных сит в связи с размерами и конформацией макромолекул	298
12.4. Электрофорез	299
Расчет электрофоретической подвижности	299
Примеры применения электрофореза	301
Электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия как метод определения молекулярных масс	303
Краткие выводы	306
Задачи	307
Литература	307
Глава 13. Рентгеновская кристаллография. Перевод И. Я. Скуратовского	309
13.1. Рассеяние рентгеновских лучей атомами и молекулами	309
Особенности и ограничения нашего рассмотрения	309
Рентгеновские лучи — коротковолновое электромагнитное излучение	309
Параметры, описывающие электромагнитную волну	310
Геометрия опыта по рассеянию рентгеновских лучей	312
Рассеяние как функция положения электрона	314
Описание рентгеновского рассеяния с помощью фурье-преобразования	315
Пример свойств фурье-преобразования	317
Определение структурного фактора	319
Требование неоднородности электронной плотности	320
Рассеяние от отдельного атома, находящегося в начале координат	320
Рассеяние произвольно расположенными атомами	322
13.2. Дифракция рентгеновских лучей	323
Интерференционные полосы от наборов атомов	323
Расчет рентгеновской дифракции от одномерной цепочки атомов	326
Дискретная картина дифракции от одномерной цепочки	327
Рассеяние от отдельного атома или молекулы, входящих в состав периодической цепочки	329
Рентгеновское рассеяние, наблюдаемое в лабораторных условиях	330
Рентгеновское рассеяние от двумерной периодической атомной решетки	331
Рентгеновское рассеяние от трехмерной атомной решетки	334
Рентгеновское рассеяние от трехмерного кристалла, состоящего из молекул	338
Представление повторяющейся структуры в виде свертки	338
Фурье-преобразование свертки	340

Использование сверток при расчете картин рентгеновского рассеяния	341
Расчет дифракции от молекулярного кристалла с использованием сверток	343
Закон дифракции Брэгга	344
13.3. Свойства кристаллов	346
Ограничения для возможных кристаллических решеток	346
Симметрия молекул и кристаллов	352
Пространственные группы, характерные для биологических молекул	352
Определение параметров кристаллической решетки	354
Соотношения между векторами прямой и обратной решеток	355
Определение пространственной группы	357
Кристаллографическая оценка молекулярной массы	358
Использование пространственной группы для получения информации о симметрии макромолекулы	359
Изменение геометрии рассеяния при дифракционных измерениях	360
Некоторые методы получения дифракционных данных	362
Сфера ограничения	364
Ограниченность разрешения при определении структуры по данным дифракции рентгеновских лучей	364
Экспериментальные ограничения разрешения	368
13.4. Определение структуры молекул методом рентгеновской кристаллографии	369
Фазовая проблема	369
Фазы важнее, чем амплитуды	370
Общие соображения относительно определения кристаллической структуры	371
Этапы определения структуры малой молекулы	371
Вычисление функции Паттерсона по измеренной интенсивности рассеяния	373
Периодичность функции Паттерсона	375
Соответствие между пиками функции Паттерсона и межатомными векторами	376
Использование паттерсоновских карт для локализации тяжелых атомов в малых молекулах	376
Проверка согласия между рассчитанной структурой и данными измерений	378
13.5. Определение структуры макромолекулы	378
Метод множественных изоморфных замещений	378
Получение макромолекулярных кристаллов и их свойства	379
Получение изоморфных тяжелоатомных производных	381
Структурные факторы для тяжелоатомных изоморфных производных	383
Определение положений тяжелых атомов с помощью разностной паттерсоновской карты	384
Использование центросимметричных проекций для определения положения тяжелых атомов	385
Использование данных о положении тяжелых атомов для оценки фаз структурного фактора	389
Оценки фаз при наличии центра симметрии	390
Уточнение положений тяжелых атомов, получаемое после оценки фаз для исходного кристалла	391
Уточнение структурной модели по методу наименьших квадратов	391
Метод наименьших квадратов для уточнения положений тяжелых атомов	393
Аномальная дисперсия в тяжелых атомах	396
Интерпретация карты электронной плотности	396
Учет энергии белковых конформаций при интерпретации карты электронной плотности	398
Разностный фурье-синтез при изучении взаимодействий макромолекулы с лигандом	398

Краткие выводы	400
Задачи	401
Литература	403
<i>Глава 14. Другие методы, использующие рассеяние и дифракцию. Перевод И. Я. Скуратовского</i>	405
14.1. Рентгеновская дифракция в волокнах	405
Рентгеновское рассеяние от волокон	405
Расчет рассеяния от спирали	407
Структурный фактор непрерывной спирали в цилиндрических координатах	408
Дискретный характер структурного фактора спирали	409
Крестообразная картина рассеяния от спиральной линии	410
Структурный фактор точечной спирали	411
Структурный фактор спирали с целым числом остатков на виток	413
Структурный фактор спирали с нецелым числом остатков на виток	414
Интенсивность рентгеновского рассеяния от спирали, усредненной по вращению	414
Модель для α -спирали	415
Рентгеновское рассеяние от реальной α -спирали	418
Влияние межмолекулярной упаковки на картину дифракции от α -спирали	419
Рентгеновское рассеяние от волокон нуклеиновых кислот	419
14.2. Рентгеновское рассеяние в растворе	421
Расчет рассеяния от раствора путем усреднения по всем возможным ориентациям молекул	421
Определение молекулярной массы и радиуса инерции	422
Использование широкоугольного рассеяния для выбора модели молекулярной структуры	423
Расчет радиальной функции Паттерсона по данным рассеяния в растворе	426
Тонкая структура растянутого края поглощения (EXAFS)	427
14.3. Рассеяние излучения других видов	428
Пригодная для измерений область длин волн	428
14.4. Электронная микроскопия	429
Измерение электронной дифракции от твердого тела с помощью электронного микроскопа	429
Определение молекулярной структуры с помощью электронного микроскопа ...	431
Математическое описание дифракции электронов	431
14.5. Нейтронное рассеяние	437
Сравнение нейтронного и рентгеновского рассеяний	437
Локализация атомов водорода с помощью нейтронной дифракции в кристаллах	438
Контраст с растворителем при нейтронном и рентгеновском рассеянии	439
Ковалентно присоединенный дейтерий в качестве нейтронной метки	442
14.6. Рассеяние света	445
Одиночные молекулы, размер которых много меньше длины волны	445
Влияние поляризации на угловое распределение рассеянного света	446
Набор молекул, размер которых много меньше длины волны	447
Молекулы, размер которых сравним с длиной волны	448
Другие типы рассеяния света	449

Краткие выводы	449
Задачи	451
Литература	452
Приложение А. Основы матричной алгебры	454
Перемножение матриц	454
Нахождение матрицы, обратной данной	456
Приведение матрицы к диагональному виду	456
Приложение Б. Решение задач	458
Предметный указатель	468

Уважаемый читатель!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:

129820, Москва, И-110, ГСП,

1-й Рижский пер., д. 2,

издательство «Мир».

Чарлз Р. Кантор, Пол Р. Шиммел
БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том II

Научные редакторы Н. А. Райская, Н. Н. Шафрановская
Мл. редактор З. Е. Кожанова
Художник Б. А. Шляпугин
Художественный редактор Ю. Л. Максимов
Технические редакторы Л. П. Чуркина, Л. А. Тихомирова
Корректоры Н. А. Вавилова, И. С. Голубева

ИБ №3073

Подписано к печати 4.06.84.
Формат 70 × 100 1/16 Бумага офсетная № 1
Гарнитура Таймс. Печать офсетная.
Объем 15,50 бум. л. Усл. печ. л. 40,30.
Усл. кр.-отт. 60,00. Уч.-изд. л. 40,21.
Изд. № 4/1931. Тираж 8300 экз. Зак. 84.
Цена 3 р. 30 к.

Набрано в издательстве «Мир» на фотонаборном комплексе «Компьюграфик»
129820, ГСП Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Можайский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома при Государственном
комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли.
143200, Можайск, ул. Мира, 93.

Издательство «Мир»
выпускает в свет в 1985 г.
ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМА. Сб. статей. Пер. с англ.

В книге ученых из СССР, Англии, США, ФРГ и других стран приведены современные представления о путях эволюции генома, эволюции «семейств» генов, структуре клеточного ядра, механизмах адаптации, о роли эволюции генетического аппарата в образовании видов.

Для молекулярных биологов, биохимиков, генетиков, эволюционистов.

Эту книгу можно приобрести во всех магазинах, распространяющих научно-техническую литературу.